

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

*Superando los límites del cultivo:
taxogenómica y genómica comparativa de nuevas
haloarqueas*

Tesis Doctoral

Ana Durán Viseras

Sevilla, 2020



FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología y Parasitología

Memoria que presenta la Gda. en
Farmacia Ana Durán Viseras para optar
al grado de Doctor por la Universidad de
Sevilla

La doctoranda

Fdo. Ana Durán Viseras



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

ANTONIO VENTOSA UCERO, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y CRISTINA SÁNCHEZ-PORRO ÁLVAREZ, PROFESORA TITULAR, DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Superando los límites del cultivo: taxogenómica y genómica comparativa de nuevas haloarqueas” presentada por la Graduada en Farmacia D^a. ANA DURÁN VISERAS para optar al grado de Doctor ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Sevilla, a 26 de Diciembre de 2019.

Fdo.: Antonio Ventosa Ucero

Fdo.: Cristina Sánchez-Porro Álvarez



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología y Parasitología

MIGUEL ÁNGEL CAVIEDES FORMENTO, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Superando los límites del cultivo: taxogenómica y genómica comparativa de nuevas haloarqueas” presentada por la Graduada en Farmacia D^a. ANA DURÁN VISERAS para optar al grado de Doctor ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos, bajo la dirección de los Doctores D. Antonio Ventosa Utero y Dña. Cristina Sánchez-Porro Álvarez.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Sevilla, a 26 de Diciembre de 2019.

Fdo.: Miguel Ángel Caviedes Formento

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada mediante los siguientes proyectos de investigación:

“Biodiversidad microbiana de suelos salinos: una aproximación molecular y metagenómica” (P10-CVI-6226) subvencionado por la Junta de Andalucía durante el período 2012-2016.

“De la metagenómica al cultivo puro: *Spiribacter salinus*” (CGL2013-46941-P), subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación durante el período 2014-2017.

“Microbiomas de ambientes hipersalinos: suelos versus salinas” (CGL2017-83385-P), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad durante el período 2018-2020.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2019). ***Halonotius aquaticus* sp. nov., a new haloarchaeon isolated from a marine saltern.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 69: 1306-1312.

Durán-Viseras, A., Andrei, A.Ş., Ghai, R., Sánchez-Porro C. & Ventosa, A. (2019). **New *Halonotius* species provide genomics-based insights into cobalamin synthesis in haloarchaea.** Front. Microbiol. 10: 1928. (Premio a la mejor publicación del mes de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla)

Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2019). ***Halorientalis pallida* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a marine saltern.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 69: 3636-3643.

Durán-Viseras, A., Andrei, A.Ş., Vera-Gargallo, B., Ghai, R., Sánchez-Porro C. & Ventosa, A. **Culturomics-based genomics sheds light on the ecology of the new haloarchaeal genus *Halosegnis*.** Enviado a Environmental Microbiology.

Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. ***Haloglomus irregulare* gen. nov., sp. nov., a new halophilic archaeon isolated from a marine saltern.** Enviado a Microorganisms.

Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. ***Natronomonas salsuginis* sp. nov., a new extremely halophilic archaeon isolated from a marine saltern.** En preparación.

Y en las comunicaciones a congresos:

Durán-Viseras, A., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. **Biodiversidad de suelos hipersalinos basada en técnicas tradicionales de cultivo.** XXV Congreso Nacional de Microbiología. Logroño, 2015. Comunicación en panel.

Durán-Viseras, A., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. **Culturable microbial diversity from saline soils: new haloarchaea.** 11th International Meeting on Halophilic Microorganisms “Halophiles 2016”. San Juan (Puerto Rico), 2016. Comunicación en panel.

Durán-Viseras, A., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. **Nuevas haloarqueas de suelos hipersalinos.** XVI Reunión del Grupo Especializado en Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad de la Sociedad Española de Microbiología. Santiago de Compostela, 2016. Comunicación oral.

Durán-Viseras, A., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. **Caracterización de dos nuevas especies del género *Halorubrum*.** XIII Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Alicante, 2016. Comunicación oral.

Durán-Viseras, A., León, M.J., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. **Culture-dependent study of archaea & bacteria from salterns & saline soils with different salinity ranges.** 7th Congress of European Microbiologists (FEMS)-26th Congress of the Spanish Society for Microbiology. Valencia, 2017. Comunicación en panel.

Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. **Estudios dependientes de cultivo de arqueas y bacterias a partir de estanques con diferentes salinidades y de suelos salinos.** XIV Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Ourense, 2017. Comunicación oral.

Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. **Aislamiento y caracterización de nuevas haloarqueas de las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta, Huelva.** XV Reunión de la Red Nacional de Microorganismos Extremófilos. Matalascañas, Huelva, 2018. Comunicación oral.

Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. ***Halonotius aquaticus* sp. nov. y *Halonotius terrestris* sp. nov., dos nuevas haloarqueas de ambientes hipersalinos.** XVII Reunión del Grupo Especializado en Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad y XII Reunión del Grupo Especializado en Microbiología del Medio Acuático de la Sociedad Española de Microbiología. Sitges, 2018. Comunicación oral. (Premio a la mejor comunicación oral)

Durán-Viseras, Andrei, A.Ş., Ghai, R., Sánchez-Porro C. & Ventosa, A. **Genome-scale metabolic reconstructions of new *Halonotius* species designated cobalamin synthesis as a Black Queen (BQ) function in haloarchaea.** 12th International Meeting on Halophilic Microorganisms “Halophiles 2016”. Cluj-Napoca (Rumania), 2019. Comunicación en panel.

Sánchez-Porro C., Durán-Viseras, & Ventosa, A. ***Halorientalis pallida* sp. nov., a new extremely halophilic archaeon isolated from a marine saltern in Spain.** 12th International Meeting on Halophilic Microorganisms “Halophiles 2016”. Cluj-Napoca (Rumania), 2019. Comunicación en panel.

Durán-Viseras, Andrei, A.Ş., Ghai, R., Sánchez-Porro C. & Ventosa, A. **Análisis genómico comparativo y taxonómico del género *Halonotius*.** XXVII Congreso Nacional de Microbiología. Málaga, 2019. Comunicación oral.

Sánchez-Porro C., Durán-Viseras, & Ventosa, A. ***Halorientalis pallida* sp. nov., una nueva haloarquea aislada de una salina solar.** XXVII Congreso Nacional de Microbiología. Málaga, 2019. Comunicación en panel.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. La vida en ambientes extremos	3
I.2. Ambientes hipersalinos y microorganismos halófilos	5
I.2.I. Ambientes hipersalinos acuáticos	6
I.2.II. Suelos hipersalinos	8
I.2.III. Ambientes hipersalinos estudiados	9
I.2.III.I. Salinas de Isla Cristina	9
I.2.III.II. Salinas de Isla Bacuta	9
I.2.III.III. Suelos hipersalinos en las Marismas del Odiel	10
I.2.IV. Microorganismos halófilos	11
I.2.IV.I. Concepto y clasificación	11
I.2.IV.II. Filogenia y taxonomía	12
I.2.IV.II.1. Arqueas	13
I.2.IV.II.2. Bacterias	15
I.2.IV.II.3. Eucariotas	15
I.2.IV.II.4. Virus	16
I.2.IV.III. Mecanismos de osmoadaptación	18
I.2.IV.IV. Potencial biotecnológico	22
I.2.V. Ecología y biodiversidad	23
I.2.V.I. Ecología y biodiversidad en ambientes acuáticos	23
I.2.V.II. Ecología y biodiversidad en suelos salinos	27
I.2.VI. Metabolismo de la clase <i>Halobacteria</i>	31
I.2.VI.I. Metabolismo del carbono	31
I.2.VI.II. Metabolismo del nitrógeno	36
I.2.VI.III. Metabolismo anaerobio	38
I.2.VI.IV. Otros metabolismos	39
I.3. La importancia del cultivo puro	41
I.4. Taxonomía clásica vs taxonomía moderna	42
I.5. Grupos estudiados para la descripción de nuevos taxones	46
I.5.I. Orden <i>Halobacteriales</i>	46
I.5.I.I. El género <i>Halorientalis</i>	47
I.5.I.II. El género <i>Natronomonas</i>	47
I.5.II. Orden <i>Haloferacales</i>	48
I.5.II.I. El género <i>Halonotius</i>	49
II. OBJETIVOS	51
III. MATERIAL Y MÉTODOS	57
III.1. Muestreos y tratamiento de las muestras	59
III.2. Medios de aislamiento	60

III.2.I. Medio R2A	61
III.2.II. Medio piruvato	61
III.2.III. Medio glicerol	62
III.2.IV. Medios con extractos	62
III.3. Tratamiento de las muestras y aislamiento de cepas	62
III.4. Material biológico	63
III.4.I. Cepas aisladas	63
III.4.II. Cepas de colección	63
III.4.III. Cultivo, mantenimiento y conservación de las cepas	64
III.5. Estudio filogenético de las cepas aisladas	65
III.5.I. Extracción, purificación y determinación de la concentración y pureza del ADN	66
III.5.I.I. Método de Marmur modificado	66
III.5.I.II. Purificación del ADN genómico	67
III.5.I.III. Electroforesis en geles de agarosa	67
III.5.I.IV. Determinación de la concentración y pureza del ADN	68
III.5.II. Amplificación del ADN mediante PCR	68
III.5.III. Estudios de clonación	71
III.5.III.I. Protocolo de ligación	71
III.5.III.II. Transformación de células competentes por choque térmico	72
III.5.III.III. Extracción del ADN plasmídico	73
III.5.IV. Secuenciación de los productos de PCR	74
III.5.V. Análisis filogenético de las secuencias	76
III.5.V.I. ChromasPro	76
III.5.V.II. Blast y Ez-Biocloud	76
III.5.V.III. ARB	77
III.5.V.IV. BioEdit	78
III.5.V.V. MEGA	78
III.6. Caracterización quimiotaxonómica de las cepas aisladas	78
III.6.I. Extracción de lípidos polares	78
III.6.II. Análisis e identificación de lípidos polares por HPTLC	80
III.7. Caracterización fenotípica	81
III.7.I. Características morfológicas	81
III.7.II. Características fisiológicas	81
III.7.III. Características bioquímicas	82
III.7.III.I. Prueba de la oxidasa	82
III.7.III.II. Prueba de la catalasa	82
III.7.III.III. Producción de indol	83
III.7.III.IV. Prueba del rojo de metilo	83

III.7.III.V. Prueba de Voges-Proskauer	83
III.7.III.VI. Reducción de los nitratos y nitritos	84
III.7.III.VII. Producción de ácido sulfhídrico	85
III.7.III.VIII. Citrato de Simmons	85
III.7.III.IX. Prueba de la ureasa	86
III.7.III.X. Prueba de las descarboxilasas	86
III.7.III.XI. Producción de ácidos a partir de carbohidratos	86
III.7.III.XII. Hidrólisis del almidón, gelatina, ADN, esculina y Tween 80	87
III.7.IV. Pruebas nutricionales	88
III.7.IV.I. Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía	88
III.7.IV.II. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía	89
III.8. Estudios genómicos	89
III.8.I. Secuenciación del ADN genómico	89
III.8.II. Análisis bioinformático	90
III.8.II.I. Control de calidad y ensamblaje	90
III.8.II.II. Anotación de secuencias genómicas	91
III.8.III. Análisis genómico comparativo	93
III.8.III.I. Estimación de la posición filogenómica	93
III.8.III.II. Estimación de la semejanza genómica entre microorganismos	94
III.8.III.III. Representaciones genómicas	95
III.8.III.IV. Sintenia	95
III.8.III.V. Determinación del punto isoeléctrico y la frecuencia de aminoácidos	95
III.8.III.VI. Determinación de la presencia de secuencias víricas y sistemas de CRISPR/Cas	96
III.8.III.VII. Análisis de rodopsinas	96
III.8.IV. Ecología ambiental	96
III.8.IV.I. Abundancia de secuencias metagenómicas	96
III.8.IV.II. Reclutamiento metagenómicos	97
III.8.IV.III. Identificación de enzimas de interés en las bases de datos metagenómicas	98
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
IV.1. Aislamiento de nuevas cepas de haloarqueas y bacterias halófilas	101
IV.2. Estudio de cepas pertenecientes al orden Halobacteriales	107
IV.2.I. Aislamiento y caracterización de la cepa F13-25 ^T	107

IV.2.I.I. Descripción de <i>Halorientalis pallida</i> sp. nov.	116
IV.2.I.II. Descripción corregida del género <i>Halorientalis</i>	116
IV.2.II. Aislamiento y caracterización de la cepa F20-122 ^T	117
IV.2.II.I. Descripción de <i>Natronomonas salsuginis</i> sp. nov.	124
IV.2.III. Aislamiento y caracterización de la cepa F16-60	125
IV.2.III.I. Descripción de <i>Haloglomus</i> gen. nov.	133
IV.2.III.II. Descripción de <i>Haloglomus irregulare</i> sp. nov.	134
IV.2.III.III. Ecología y abundancia del género <i>Haloglomus</i>	135
IV.2.IV. Aislamiento, caracterización y análisis genómico de las cepas F12-1, F17-44, F18-79 y F19-13	137
IV.2.IV.I. Aislamiento, filogenia e índices de relatividad de los nuevos aislados	137
IV.2.IV.II. Caracterización fenotípica y quimiotaxonómica	141
IV.2.IV.III. Descripción de <i>Halosegnis</i> gen. nov.	145
IV.2.IV.IV. Descripción de <i>Halosegnis longus</i> sp. nov.	145
IV.2.IV.V. Descripción de <i>Halosegnis rubeus</i> sp. nov.	146
IV.2.IV.VI. Características genómicas de los nuevos aislados	147
IV.2.IV.VII. Ecología y distribución del género <i>Halosegnis</i>	151
IV.2.IV.VIII. Metabolismo del género <i>Halosegnis</i>	154
IV.2.IV.IX. Osmorregulación	157
IV.2.IV.X. Rodopsinas	160
IV.3. Estudio de cepas pertenecientes al orden <i>Haloferacales</i>	162
IV.3.I. Aislamiento y caracterización de la cepa F13-13	162
IV.3.I.I. Descripción de <i>Halonotius aquaticus</i> sp. nov.	167
IV.3.II. Aislamiento y caracterización de las cepas F15B y F9-27	168
IV.3.II.I. Descripción de <i>Halonotius terrestris</i> sp. nov.	175
IV.3.II.II. Descripción de <i>Halonotius roseus</i> sp. nov.	176
IV.3.II.III. Descripción corregida del género <i>Halonotius</i>	177
IV.3.III. Análisis genómico comparativo del género <i>Halonotius</i>	177
IV.3.III.I. Ecología, distribución y abundancia del género <i>Halonotius</i>	178
IV.3.III.II. Metabolismo	182
IV.3.III.III. Biosíntesis de cobalamina (vitamina B12)	185
IV.3.III.IV. Osmorregulación	188
IV.3.III.V. Análisis de rodopsinas	190
V. RESUMEN	193

VI. SUMMARY	199
VII. CONCLUSIONES	205
VIII. CONCLUSIONS	211
IX. BIBLIOGRAFÍA	217
X. ANEXO	275

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Categorías de microorganismos extremófilos y extremotolerantes según la naturaleza de su adaptación (adaptado de Torsvik y Øvreås, 2008).	4
Tabla 2.	Tipos de transportadores implicados en el mecanismo de osmoadaptación <i>salt-in</i> de la clase <i>Halobacteria</i> (adaptado de Jensen <i>et al.</i> , 2015).	19
Tabla 3.	Muestras estudiadas en este trabajo y sus características fisicoquímicas.	59
Tabla 4.	Cepas de colección utilizadas en este trabajo.	63
Tabla 5.	Cebadores utilizados para la amplificación de los genes ARNr 16S de bacterias y arqueas y del gen <i>rpoB</i> de arqueas. Las secuencias de los cebadores se muestran de acuerdo con el código de la IUPAC para la denominación de nucleótidos ambiguos. La posición de los cebadores se indica con respecto a la numeración de <i>Escherichia coli</i> .	69
Tabla 6.	Cebadores utilizados para la secuenciación del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas. Las secuencias de los cebadores se muestran de acuerdo al código de la IUPAC para la denominación de nucleótidos ambiguos. La posición de los cebadores se indica con respecto a la numeración de <i>Escherichia coli</i> .	75
Tabla 7.	Resumen de las diferentes actividades hidrolíticas.	87
Tabla 8.	Carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos estudiados para determinar su utilización como única fuente de carbono y energía. Aminoácidos y derivados estudiados para determinar su utilización como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.	89
Tabla 9.	Bases de datos metagenómicas empleadas en este trabajo.	97
Tabla 10.	Cepas aisladas (haloarqueas y bacterias halófilas) a partir de los diferentes ambientes estudiados.	102
Tabla 11.	Número de cepas aisladas (haloarqueas y bacterias halófilas) ordenadas a nivel de género.	102
Tabla 12.	Haloarqueas y bacterias halófilas seleccionadas como posibles nuevos taxones en base a la comparación de la secuencia casi completa del gen ARNr 16S.	106
Tabla 13.	Características generales de los genomas de la cepa F13-25 ^T y de las cepas tipo de las especies del género <i>Halorientalis</i> utilizadas en este estudio.	110
Tabla 14.	Matriz con los porcentajes de ANI y DDH obtenidos entre la cepa F13-25 ^T y las cepas tipo de las especies del género <i>Halorientalis</i> y otros géneros relacionados, de los que se dispone de sus genomas.	111

Tabla 15.	Características que diferencian a la cepa F13-25 ^T de las especies <i>Halorientalis regularis</i> JCM 16425 ^T y <i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T . Cepas: 1, F13-25 ^T ; 2, <i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T ; 3, <i>Halorientalis regularis</i> JCM 16425 ^T . Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con: ^a tomados de Amoozegar et al., (2014) y ^b tomados de Cui et al., (2011) y +, Reacción positiva; -, reacción negativa.	113
Tabla 16.	Características generales de los genomas de la cepa F20-122 ^T y de las especies del género <i>Natronomonas</i> utilizadas en este estudio.	119
Tabla 17.	Matriz con los porcentajes de ANI y DDH obtenidos entre la cepa F20-122 ^T y las especies del género <i>Natronomonas</i> y otros géneros relacionados.	120
Tabla 18.	Características que diferencian a la cepa F20-122 ^T de la especie <i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T . Cepas: 1, F20-122 ^T ; 2, <i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T . Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con *, tomados de Burns et al., (2010a). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.	122
Tabla 19.	Características generales del genoma de la cepa F16-60 ^T .	127
Tabla 20.	Porcentajes de identidad aminoacídica media (AAI) entre la cepa F16-60 ^T y los genomas de las especies tipo de los géneros del orden <i>Halobacteriales</i> . Cepas: 1, <i>Halosimplex carlsbadense</i> 2-9-1 ^T ; 2, <i>Halorhabdus utahensis</i> DSM 12940 ^T ; 3, <i>Halorientalis regularis</i> IBRC-M 10760 ^T ; 4, <i>Haloarcula vallismortis</i> ATCC 29715 ^T ; 5, <i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T ; 6, <i>Halobacterium salinarum</i> NRC-1 ^T ; 7, <i>Halomicrobium mukohatei</i> DSM 12286 ^T ; 8, <i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T ; 9, <i>Halapricum salinum</i> CBA 1105 ^T ; 10, Cepa F16-60 ^T ; 11, <i>Halomarina oriensis</i> SPP-AMP-1 ^T .	130
Tabla 21.	Características diferenciales de la cepa F16-60 ^T y <i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T . Cepas: 1, Cepa F16-60 ^T ; 2, <i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T . Todos los datos son de este estudio, excepto los indicados con *, datos tomados de Burns et al., (2010a). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo; ND, no determinado.	132
Tabla 22.	Especies filogenéticamente más cercanas a las cepas F12-1 ^T , F17-44 ^T , F18-79 y F19-13, en base a la comparación de secuencias del gen ARNr 16S.	137
Tabla 23.	Especies filogenéticamente más cercanas a las cepas F12-1 ^T , F17-44 ^T , F18-79 y F19-13, en base a la comparación de secuencias del gen <i>rpoB</i> ^T .	137
Tabla 24.	Porcentajes de hibridación ADN-ADN <i>in silico</i> (DDH) entre los nuevos aislados y los genomas de las cepas tipo de las especies de <i>Natronomonas</i> .	141
Tabla 25.	Características fenotípicas diferenciales entre las cepas F12-1 ^T , F17-44 ^T , F18-79 y F19-13. Cepas: 1, cepa F12-1 ^T ; 2, cepa F7-44 ^T ; 3, cepa F18-79; 4, cepa F19-13. Todos	143

los datos son de este estudio. +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.

Tabla 26.	Características que diferencian las cepas F12-1 ^T y F17-44 ^T de <i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T . Cepas: 1, F12-1 ^T ; 2, F7-44 ^T ; 3, <i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T . Todos los datos son de este estudio, excepto los indicados con *, datos tomados de Burns et al., (2010a). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.	144
Tabla 27.	Características generales de los genomas de los cuatro aislados.	148
Tabla 28.	Características que diferencian a la cepa F13-13 ^T de las especie <i>Halonotius pteroides</i> . Cepas: 1, F13-13 ^T ; 2, <i>Halonotius pteroides</i> CECT 7525 ^T . Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con *, datos tomados de Burns et al., (2010b). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.	164
Tabla 29.	Matriz con los porcentajes de ANI y DDH obtenidos entre los genomas de las cepas pertenecientes al género <i>Halonotius</i> .	171
Tabla 30.	Características que diferencian a las cepas F15B ^T y F9-27 ^T de las especies descritas del género <i>Halonotius</i> . Cepas: 1, F15B ^T ; 2, F9-27 ^T ; 3, <i>Halonotius aquaticus</i> F13-13 ^T ; 4, <i>Halonotius pteroides</i> CECT 7525 ^T . Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con *, datos tomados de Burns et al., (2010b). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.	173
Tabla 31.	Características generales de los genomas de las cepas tipo de las especies del género <i>Halonotius</i> secuenciados en este estudio.	178

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ejemplos de ambientes extremos: A) Río Tinto (Huelva), B) cuenca volcánica Dallol (Etiopía), C) lago Deep (Antártida).	3
Figura 2.	Ejemplos de ambientes hipersalinos talasosalinos: A) salinas de Es Trenc (Mallorca), B) lago Tyrrell (Australia). Ejemplos de ambientes hipersalinos atalasosalinos: C) Mar Muerto (Israel/Jordania), D) lago Natron (Tanzania).	7
Figura 3.	Ambientes hipersalinos estudiados: A) salinas de Isla Cristina (Huelva), B) salinas de Isla Bacuta (Huelva), C-D) suelos salinos localizados en las Marismas del Odiel (Huelva).	11
Figura 4.	Esquema de los distintos órdenes, familias y géneros de la clase <i>Halobacteria</i> (adaptado de Amoozegar <i>et al.</i> , 2017).	13
Figura 5.	Representación de los ciclos glicolisis, gluconeogénesis y Entner-Doudoroff modificado para haloarqueas. Los nombres en verde corresponden a las enzimas únicas del ciclo glicolítico, en naranja las del ciclo gluconeogénico y en azul las enzimas comunes de ambos ciclos. En violeta se muestran las enzimas correspondientes a la ruta Entner-Doudoroff modificada para haloarqueas.	33
Figura 6.	Representación de la ruta de las pentosas fosfato. Los nombres en azul corresponden a las enzimas.	34
Figura 7.	Representación de: A) ciclo de los ácidos tricarboxílicos; B) ciclo del glioxilato.	35
Figura 8.	Representación del metabolismo del nitrógeno (adaptado de Bonete <i>et al.</i> , 2008). A) Ciclo del nitrógeno, B) Rutas para la formación de glutamato a partir del ion amonio. En azul se representan los nombres de las rutas (A) y las enzimas (B)).	37
Figura 9.	Representación de los diferentes tipos de rodopsinas microbianas (Vera-Gargallo, 2018).	40
Figura 10.	Esquema general de las reacciones de PCR del gen ARNr 16S.	70
Figura 11.	Esquema general de las reacciones de PCR del gen <i>rpoB</i> '.	70
Figura 12.	Representación gráfica del vector de clonación pGEM® -T.	72
Figura 13.	Observación de la apariencia coloreada de las colonias a las 24 horas.	72
Figura 14.	Estrategia seguida para el solapamiento de los cebadores utilizados en la secuenciación del gen ARNr 16S.	75

Figura 15.	Estrategia seguida para el solapamiento de los cebadores utilizados en la secuenciación del gen <i>rpoB'</i> .	75
Figura 16.	Cromatografía en capa fina: A) Extractos lipídicos obtenidos; B) Aplicación de la muestra en la placa de TLC; C) Desarrollo de la cromatografía.	80
Figura 17.	Esquema de la reducción de nitratos.	84
Figura 18.	Porcentaje global de las cepas aisladas agrupadas por géneros que se han obtenido de cada uno de los ambientes estudiados. A) Salinas de Isla Cristina, B) Salinas de Isla Bacuta, C) Suelo hipersalino de las Marismas del Odiel.	103
Figura 19.	Árbol filogenético obtenido por el método <i>maximum-parsimony</i> basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-25 ^T y las especies del género <i>Halorientalis</i> y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con los algoritmos <i>maximum-likelihood</i> y <i>neighbour-joining</i> . La especie <i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500 ^T se ha utilizado como <i>outgroup</i> . La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	108
Figura 20.	Árbol filogenético obtenido por el método <i>neighbour-joining</i> basado en la comparación de secuencias del gen <i>rpoB'</i> en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-25 ^T y las especies del género <i>Halorientalis</i> y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con el algoritmo <i>maximum-likelihood</i> . La especie <i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500 ^T se ha utilizado como <i>outgroup</i> . La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	109
Figura 21.	Árbol filogenómico obtenido por el método <i>neighbour-joining</i> , basado en la comparación de 367 genes <i>core-orthologous</i> , en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-25 ^T y las especies del género <i>Halorientalis</i> y de otros géneros filogenéticamente cercanos de los que se dispone de genomas. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	111
Figura 22.	Diagrama de Venn que representa el número de genes compartidos entre los genomas de la cepa F13-25 ^T y de las cepas tipo de las especies de <i>Halorientalis</i> estudiadas.	112

Figura 23.	Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F13-25 ^T . Escala, 10 µm.	113
Figura 24.	Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F13-25 ^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C. Carriles: 1, <i>Halobacterium salinarum</i> DSM 3754 ^T ; 2, Cepa F13-25 ^T ; 3, <i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T ; 4, <i>Halorientalis regularis</i> JCM 16425 ^T ; 5, <i>Halovenus aranensis</i> IBRC-M 10015 ^T .	115
Figura 25.	Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de fosfolípidos de la cepa F13-25 ^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con azul de molibdeno. Carriles: 1, Cepa F13-25 ^T ; 2, <i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T ; 3, <i>Halorientalis regularis</i> JCM 16425 ^T ; 4, <i>Halovenus aranensis</i> IBRC-M 10015 ^T ; 5, <i>Halobacterium salinarum</i> DSM 3754 ^T .	115
Figura 26.	Árbol filogenético obtenido por el método <i>maximum-parsimony</i> , basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F20-122 ^T y las especies del género <i>Natronomonas</i> y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con los algoritmos <i>maximum-likelihood</i> y <i>neighbour-joining</i> . La especie <i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500 ^T se ha utilizado como <i>outgroup</i> . La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	118
Figura 27.	Árbol filogenético obtenido por el método <i>neighbour-joining</i> , basado en la comparación de secuencias del gen <i>rpoB</i> , en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F20-122 ^T y las especies del género <i>Natronomonas</i> y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con el algoritmo <i>maximum-likelihood</i> . La especie <i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500 ^T se ha utilizado como <i>outgroup</i> . La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	118
Figura 28.	Árbol filogenómico obtenido por el método <i>neighbour-joining</i> , basado en la comparación de 319 genes <i>core-orthologous</i> , en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F20-122 ^T y las especies del género <i>Natronomonas</i> y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	120

Figura 29.	Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F20-122 ^T . Escala, 10 µm.	121
Figura 30.	Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F20-122 ^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con A) ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C y B) azul de molibdeno. Carriles: 1, <i>Halorubrum saccharovorum</i> DSM 1137 ^T ; 2, <i>Halobacterium salinarum</i> DSM 3754 ^T ; 3, Cepa F20-122 ^T ; 4, <i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T ; 5, <i>Natronomonas pharaonis</i> CECT 4578 ^T .	123
Figura 31.	Árbol filogenético obtenido por el método <i>maximum-likelihood</i> , basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F16-60 ^T y las cepas tipo de las especies tipo de los géneros del orden <i>Halobacteriales</i> . Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con los algoritmos <i>maximum-parsimony</i> y <i>neighbour-joining</i> . La especie <i>Haloferax volcanii</i> NCIMB-2012 ^T se ha utilizado como <i>outgroup</i> . La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	125
Figura 32.	Árbol filogenético obtenido por el método <i>neighbour-joining</i> , basado en la comparación de secuencias del gen <i>rpoB</i> , en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F16-60 ^T y las cepas tipo de las especies de los géneros del orden <i>Halobacteriales</i> . Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con el algoritmo <i>neighbour-joining</i> . La especie <i>Haloferax volcanii</i> JCM 8879 ^T se ha utilizado como <i>outgroup</i> . La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	126
Figura 33.	Diagrama de Venn que representa el número de genes compartidos entre los genomas de la cepa F16-60 ^T , <i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T y <i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T .	127
Figura 34.	Árbol filogenómico obtenido por el método <i>maximum-likelihood</i> , basado en la comparación de 170 genes <i>core-orthologous</i> , en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F16-60 ^T y las especies tipo de los géneros del orden <i>Halobacteriales</i> . Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de <i>bootstrap</i> iguales o superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.	128
Figura 35.	Matriz de semejanza mostrando los porcentajes de identidad nucleotídica media (ANI) e hibridación ADN-ADN <i>in silico</i> (DDH), entre el genoma de la cepa F16-60 ^T y los genomas de las especies tipo de los géneros del orden <i>Halobacteriales</i> . Los valores de ANI y DDH se representan mediante mapas	129

de calor, cuyos valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte superior de la imagen. **Cepas:** 1, *Halosimplex carlsbadense* 2-9-1^T; 2, *Halorhabdus utahensis* DSM 12940^T; 3, *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T; 4, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715^T; 5, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T; 6, *Halobacterium salinarum* NRC-1^T; 7, *Halomicrobium mukohataei* DSM 12286^T; 8, *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T; 9, *Halapricum salinum* CBA 1105^T; 10, Cepa F16-60^T; 11, *Halomarina oriensis* SPP-AMP-1^T

- Figura 36.** Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F16-60^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con **A)** ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C y **B)** azul de molibdeno. **Carriles:** 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 2, Cepa F16-60^T; 3, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T; 4, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T; 5, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137^T. 131
- Figura 37.** Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F16-60^T. Escala, 10 µm. 132
- Figura 38.** Reclutamiento genómico de la cepa F16-60^T frente a distintos metagenomas: A) SS13, SS19 y SS37 de las salinas de Santa Pola (Alicante), B) G, R y W del lago Meyghan (Irán). Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de read ≥30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie. 136
- Figura 39.** Árboles filogenéticos obtenidos por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S (**A**) y del gen *rpoB* (**B**) en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 y especies de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. Como *outgroup* se utilizaron *Candidatus Nanosalinarum* J07AB56 y *Candidatus Nanosalina* J07AB43 han sido utilizadas como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido. 138
- Figura 40.** Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de 299 genes *core-orthologous*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 y las especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. Como *outgroup* se han utilizado *Candidatus Nanosalinarum* J07AB56 y *Candidatus Nanosalina* J07AB43 han sido utilizadas como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido. 139

- Figura 41.** Agrupamientos jerárquicos entre los genomas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 y los genomas de las especies de *Natronomonas* filogenéticamente más cercanas. Los valores de ANI y AAI se muestran mediante mapas de calor, cuyos valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte superior de la imagen. La designación de las cepas y sus números de acceso se encuentran detallados en el panel inferior. 140
- Figura 42.** Alineamiento y comparación de los genomas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13. Comparación realizada con BLASTN con longitud de alineamiento de 50 pb y semejanza superior al 85 %. Los valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte inferior de la imagen. 141
- Figura 43.** Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79, F19-13 y otras especies de haloarqueas. La placa se reveló con ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C. Carriles: 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 2, Cepa F17-44^T; 3, Cepa F12-1^T; 4, Cepa F18-79; 5, Cepa F19-13; 6, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T; 7, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T; 8, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137^T. 142
- Figura 44.** A) Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F12-1^T. B) Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F17-44^T. Escala, 10 µm. 143
- Figura 45.** Representaciones circulares de los genomas de las cepas A) F12-1^T, B) F17-44^T, C) F18-79 y D) F19-13. Desde el exterior hacia el interior: representación de los contigs donde los números reflejan el tamaño en kb, en la segunda fila en negro se representan los ARNt y en la tercera los ARNr, contenido en G+C (verde claro, valores por encima de la media; salmón, los valores por debajo de la media), GC skew (azul, valores por encima de la media; rojo, los valores por debajo de la media), coverage (verde, valores por encima de la media; violeta, los valores por debajo de la media). Para el contenido en G+C, GC skew y el coverage se ha utilizado fragmentos de 1000 pb. Los cuadrados en rojo señalan los cluster de genes amplificados en las figuras E) cepa F12-1^T y F) cepa F18-79. 150
- Figura 46.** Porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas con *Euryarchaeota* y *Halosegnis*. Los metagenomas aparecen ordenados por gradiente de salinidad. 152
- Figura 47.** A-D) Reclutamiento genómico de la cepa F12-1^T frente a distintos metagenomas, E-H) Reclutamiento genómico de la cepa F17-44^T frente a distintos metagenomas. Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de read ≥30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie. 153

- Figura 48.** Reconstrucción metabólica del género *Halosegnis*. El recuadro verde hace referencia a la ruta de glicolisis “Embden-Meyerhof-Parnas”, el azul a la de los ácidos tricarboxílicos (CAT), el rosa a la síntesis de isoprenoides: C5 (rosa oscuro) y C10-C20 (rosa claro). El recuadro violeta corresponde al ciclo del glioxilato y el naranja al de la urea. Por último, el panel verde hace referencia a la ruta biosintética de 4-aminobutanoato (GABA). El color gris se ha utilizado para marcar los genes ausentes en los genomas estudiados. 156
- Figura 49.** A) Comparación del perfil isoelectrico del proteoma de las especies de *Halosegnis* y el de otros procariotas, calculado para cada genoma traducido y mostrado como porcentaje de distribución. B) Comparación de la frecuencia de aminoácidos de las proteínas predichas para las especies del género *Halosegnis* y para otros procariotas, calculado para cada genoma traducido. 159
- Figura 50.** A) Comparación del alineamiento de las secuencias de rodopsinas de las especies del género *Halosegnis* y otras haloarqueas estudiadas. Los números de acceso de los genomas utilizados se muestran entre paréntesis. En negrita aparecen las secuencias correspondientes a las cepas de *Halosegnis*. La caja rosa muestra el aminoácido situado en la posición 199 del alineamiento. B) Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de 220 secuencias de rodopsinas. Los triángulos con transparencia fueron utilizados para resaltar las secuencias de *Halosegnis* y *Natronomonas* (ver leyenda en la parte inferior de la figura). En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido. 161
- Figura 51.** Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining*, basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB'*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-13^T, la especie *Halonotius pteroides* único representante del género *Halonotius* y especies de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. La especie *Haloferax volcanii* JCM 8879^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido. 163
- Figura 52.** Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-135^T, la especie *Halonotius pteroides* único representante del género *Halonotius* y especies de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. La especie *Haloferax* 163

volcanii NCIMB 2012^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

- Figura 53.** Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F13-13^T. Escala, 10 µm. 164
- Figura 54.** Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F13-13^T y otras especies de haloarqueas. La placa se reveló con ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C. Carriles: 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 2, Cepa F13-13^T; 3, *Halonotius pteroides* CECT 7525^T; 4, *Halohasta litorea* JCM 17270^T; 5, *Halohasta litchfieldiae* JCM 15066^T; 6, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137^T. 166
- Figura 55.** A) Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F15B^T y F9-27^T y las especies del género *Halonotius* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. B) Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F15B^T y F9-27^T y las especies del género *Halonotius* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. *Candidatus* Nanosalinarum J07AB56 y *Candidatus* Nanosalina J07AB43 se han utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido. 169
- Figura 56.** Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de 257 genes *core-orthologous*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F15B^T y F9-27^T y las especies del género *Halonotius* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. *Candidatus* Nanosalinarum J07AB56 y *Candidatus* Nanosalina J07AB43 han sido utilizadas como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido. 170
- Figura 57.** Agrupamientos jerárquicos entre los genomas de *Halonotius* cultivados y los genomas ambientales de *Halonotius*. Los valores de ANI y AAI se representan mediante mapas de calor, cuyos valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte superior de cada imagen. La designación de las cepas y sus números de acceso se encuentran detallados en el panel inferior. 171
- Figura 58.** Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos de las cepas F15B^T y F9-27^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se 174

revelaron con **A)** ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C, **B)** azul de molibdeno, **C)** ácido fosfomolibdico.

- Figura 59.** Abundancia de *Halonotius*. **(A,B)** Porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas con *Euryarchaeota* y *Halonotius*. Los metagenomas aparecen ordenados por gradiente de salinidad. **(C-H)** Reclutamientos de los genomas de las cepas F15B^T, F9-27^T y F13-13^T frente a distintos metagenomas. Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de read ≥ 30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie. 180
- Figura 60.** Reclutamientos de los genomas de las cepas F13-13^T, *Halonotius pteroides* CECT 7525^T, F15B^T, F9-27^T y frente al metagenoma SS37. Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de read ≥ 30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie. 181
- Figura 61.** Distribución global de las secuencias del gen ARNr 16S. Los círculos de colores muestran los puntos donde se han localizado secuencias de *Halonotius*, según la base de datos de SILVA. La flecha señala el lugar de donde se aislaron las cepas descritas en este trabajo. La circunferencia negra en Australia representa el sitio de donde se han extraído los genomas ambientales (MAGs) de *Halonotius*. 182
- Figura 62.** Reconstrucción metabólica de las cepas aisladas *Halonotius* sp. F13-13^T, *Halonotius* sp. 15B^T y *Halonotius* sp. F9-27^T. El panel turquesa representa la ruta de síntesis de la vitamina B₁₂ simplificada, en negrita se han representado los nombres de los genes presentes en los genomas, en gris los ausentes en arqueas y rodeados por un cuadrado rojo los ausentes en los genomas estudiados. Las flechas horizontales indican homología entre las enzimas de las rutas aerobia y anaerobia. Las líneas discontinuas corresponden a partes completas de la ruta no representadas en la figura. El recuadro verde oscuro representa la glicolisis (Embden-Meyerhof-Parnas), mientras que el verde claro la ruta Entner-Doudoroff modificada para haloarqueas. El color naranja representa el ciclo de los ácidos tricarbónicos, el rosa la síntesis de isoprenos: isoprenos C5 (naranja oscuro) e isoprenos C10-C20 (naranja claro). El recuadro violeta claro corresponde con la biosíntesis de dTDP-L-ramnosa, el color amarillo refleja la ruta asimilatoria para la reducción de los nitratos, el violeta oscuro la degradación de L-glutamato por la enzima glutamato deshidrogenasa (*GdhA*). La enzima alfa-amilasa para la degradación de la glucosa también ha sido representada con su número KO. 184
- Figura 63.** Comparación del *cluster* de genes de los genomas de *Halonotius* (n=4) implicados en la síntesis de cobalamina. **A)** Representación de los genes implicados en la primera parte de la ruta, desde uroporfirinógeno III hasta *a,c*-diamina. **B)** Representación de los genes implicados en la segunda parte de la ruta, desde *a,c*-diamina hasta vitamina B₁₂. Las estrellas rojas muestran los genes que presentan dos copias. En blanco se han 187

representado los genes no conservados en el *cluster*. La escala indica la longitud del gen en pb.

Figura 64. Comparación del perfil isoeléctrico del proteoma de las especies de *Halonotius* y el de otros procariotas, calculado para cada genoma traducido y mostrado como porcentaje de distribución. B) Comparación del perfil isoeléctrico del proteoma de las especies de *Halonotius* cultivadas y de las secuencias ambientales de *Halonotius*, calculado para cada genoma traducido y mostrado como porcentaje de distribución.

189

Figura 65. Comparación del alineamiento de las secuencias de rodopsinas de las especies del género *Halonotius* y otras haloarqueas analizadas. Los números de acceso de los genomas utilizados se muestran entre paréntesis. En negrita aparecen las secuencias correspondientes a las cepas de *Halonotius* cultivadas; el azul se corresponde con las bombas de protones de haloarqueas y el verde con las rodopsinas sensoriales. La caja verde muestra el aminoácido situado en la posición 199. B) Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de 220 secuencias de rodopsinas. Los triángulos con transparencia resaltan las secuencias de *Halonotius* (ver leyenda en la parte inferior de la figura). En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

192

INTRODUCCIÓN



1.1. La vida en ambientes extremos

A pesar de que durante mucho tiempo se ha pensado que el desarrollo de la vida solo era posible en condiciones fisicoquímicas “normales”, hoy sabemos que ésta se abre camino hasta en los rincones más inhóspitos del planeta. Estos lugares se conocen como ambientes extremos y en ellos podemos encontrar condiciones ambientales limitantes tales como pH, temperatura, presión hidrostática, radiaciones, concentración de nutrientes, oxígeno, metales pesados, toxinas y compuestos xenobióticos, potencial redox o salinidad (Figura 1) (Rodríguez-Valera, 1988).

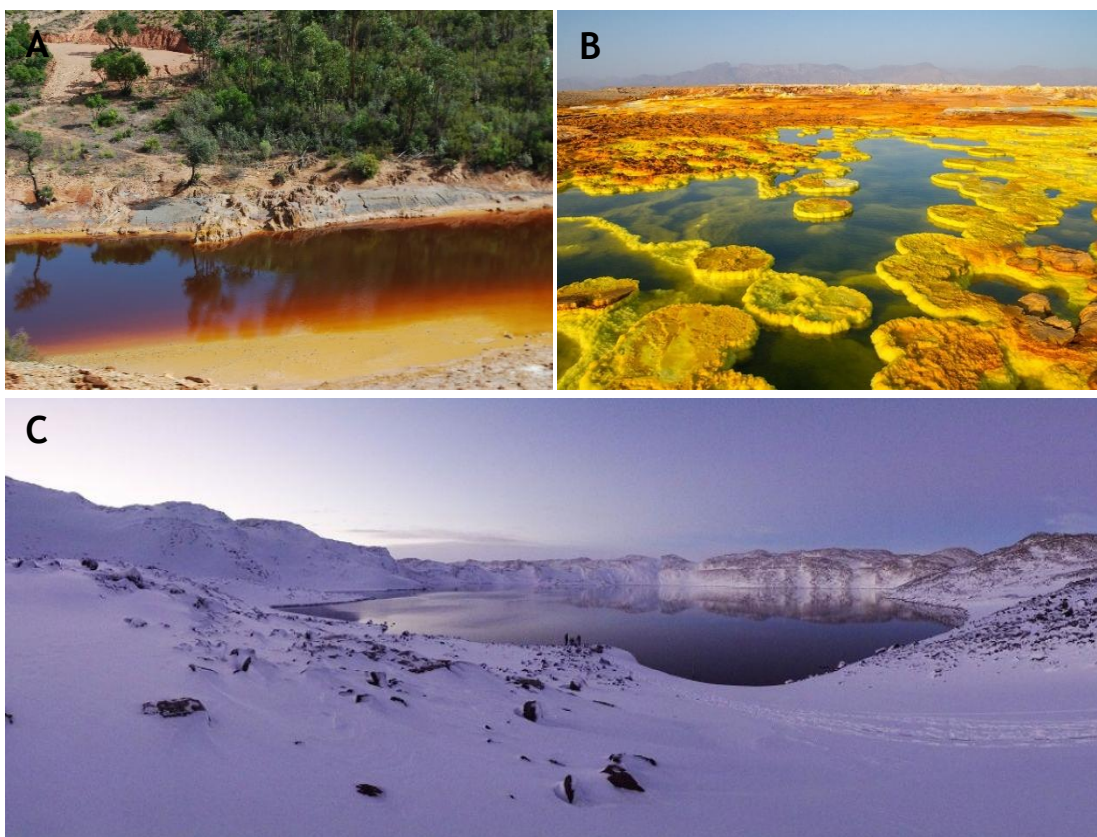


Figura 1. Ejemplos de ambientes extremos: **A)** Rio Tinto (Huelva), **B)** cuenca volcánica Dallol (Etiopía), **C)** lago Deep (Antártida).

Dado que la vida en estos ambientes requiere una serie de adaptaciones específicas de los organismos que los habitan, la diversidad que podemos encontrar en ellos es menor que la que se podría esperar en cualquier otro ambiente no extremo y solo un número limitado de grupos taxonómicos se encuentran bien adaptados a los mismos (Brock, 1979; Ventosa, 2006). Estos microorganismos reciben el nombre de **extremófilos** (Mesbah &

Wiegel, 2008, 2012) y se dividen en diferentes categorías en función de la naturaleza fisicoquímica de su adaptación (Tabla 1). Estos términos no son excluyentes, ya que podemos encontrar microorganismos capaces de crecer óptimamente en ambientes en los que coexisten varios factores ambientales extremos; así a los microorganismos que son capaces de crecer en condiciones extremas en las que la vida está limitada al menos por tres factores ambientales, se los denomina **poliextremófilos** (Bowers *et al.*, 2009; Mesbah & Wiegel, 2012). Asimismo, se ha acuñado el término **extremotrofo** o **extremotolerante** para definir a aquellos microorganismos capaces de sobrevivir en estas condiciones limitantes aunque sus condiciones óptimas de crecimiento sean otras más moderadas (Torsvik & Øvreås, 2008).

Tabla 1. Categorías de microorganismos extremófilos y extremotolerantes según la naturaleza de su adaptación (adaptado de Torsvik & Øvreås, 2008).

Condición ambiental extrema		Denominación
Temperatura	Baja	Psicrófilo, psicrotrofo o psicrotolerante
	Alta	Termófilo, hipertermófilo
pH	Ácido	Acidófilo
	Alcalino	Alcalófilo
Radiación		Radio-resistente, radio-tolerante
Metales pesados		Metalo-resistente, metalo-tolerante
Toxinas		Toxi-resistentes, toxi-tolerantes
Compuestos xenobióticos		Degradador de xenobióticos
Alta presión hidrostática		Barófilo, piezófilo o piezotolerante
Deseccación		Xerófilo, xerotolerante
Salinidad		Halófilo, halotolerante
Oscilaciones bruscas de condiciones fisicoquímicas		Poiquilotrofo, poiquilotolerante

Desde su descubrimiento, la peculiaridad de los microorganismos extremófilos y de los ambientes en los que se encuentran, ha despertado una gran fascinación por parte de la comunidad científica de todo el mundo, especialmente en el campo de la astrobiología. La peculiar fisiología de estos microorganismos y sus inusuales mecanismos de adaptación, hacen prometedora su exploración como modelo de vida en otros sistemas exteriores a la Tierra (Horikoshi *et al.*, 2011; Cray *et al.*, 2013; Fox-Powell *et al.*, 2016;

Pontefract *et al.*, 2017). Así, por ejemplo, en el laboratorio situado en la mina de Boulby (Reino Unido), una mina de sal ubicada a 1,1 km bajo la superficie de la Tierra, se llevan a cabo estudios en colaboración con la NASA, sobre la Materia Oscura en el Universo, sobre geología y geofísica o sobre la vida en ambientes extremos de nuestro planeta y en otros sistemas (Danielson *et al.*, 2019; Gluyas *et al.*, 2019).

Asimismo, los microorganismos extremófilos poseen un gran potencial biotecnológico, especialmente en los sectores de la biotecnología y la biomedicina (Rodríguez-Valera, 1992; Ventosa & Arahal, 2002; Mellado & Ventosa, 2003; Oren, 2005, 2010; Barnard *et al.*, 2010; Pastor *et al.*, 2010; Abriouel *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Gabani & Singh, 2013; Dalmaso *et al.*, 2015; Coker, 2016; Dumorné *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2019; Jorquera *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

1.2. Ambientes hipersalinos y microorganismos halófilos

Los ambientes hipersalinos son típicos ambientes extremos que se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de sal. No obstante, éste no es el único factor que limita su biodiversidad; así, en estos ambientes pueden coexistir otros factores físico-químicos como son: altas o bajas temperaturas, altos o bajos valores de pH, fuerte irradiación solar, baja disponibilidad de nutrientes o de oxígeno, o la posible presencia de metales pesados y de otros compuestos tóxicos (Rodríguez-Valera, 1988). En estos ecosistemas viven y conviven una gran cantidad de microorganismos, denominados **halófilos**, que se encuentran bien adaptados a la alta salinidad del ambiente y en muchos casos, también a algunos de los otros factores mencionados (Mesbah & Wiegel, 2012). Para lidiar con estas condiciones, los **microorganismos halófilos** han desarrollado diferentes mecanismos de supervivencia, como la síntesis de sustancias osmoprotectoras o solutos compatibles, distintos mecanismos de reparación del ADN o fotoliasas para sobrellevar la radiación UV, entre otros (Kurth *et al.*, 2017).

Los ambientes hipersalinos están representados en su mayoría por sistemas acuáticos y por suelos salinos, entre los que se encuentran los lagos salados, las salinas solares o las cuencas marinas anóxicas hipersalinas, así como los sedimentos de dichos ecosistemas y los suelos con alto contenido en sales (Ventosa *et al.*, 2008). También se incluyen las minas y los depósitos de sal subterráneos, las pieles curtidas, el interior y superficie de las plantas xerófitas del desierto y una enorme diversidad de alimentos en salmuera, salazón o fermentados (Grant *et al.*, 1998; Ventosa *et al.*, 2008; Oren, 2011b).

1.2.1. Ambientes hipersalinos acuáticos

Los ambientes hipersalinos acuáticos han sido estudiados en gran profundidad, y se definen como aquellos ambientes que tienen concentraciones de sales más elevadas que las del agua del mar, es decir, superiores a un 3,5 % (p/v) de sales totales, aproximadamente (Edgerton & Brimblecombe, 1981; Rodríguez-Valera, 1988). Atendiendo a su origen, la composición salina de los hábitats acuáticos hipersalinos puede diferir o no de la del agua del mar, clasificándose, en base a esto, en sistemas acuáticos talososalinos o atalososalinos (Ventosa, 2006).

Mientras que los **ambientes acuáticos talososalinos** tienen un origen marino y por tanto una composición salina similar a la del agua del mar, caracterizada por la predominancia de iones monovalentes Cl^- y Na^+ , y por la presencia en menor proporción de otros iones como Mg^{2+} , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} , HCO_3^- , Br^- y F^- (Ventosa & Arahal, 2002); los **ambientes acuáticos atalososalinos** provienen principalmente de la disolución de depósitos minerales de origen continental, y su composición salina, por tanto, refleja la geología, topología y condiciones climáticas del entorno en cuestión, conformando así sistemas con diversas composiciones iónicas. Algunos contienen mayoritariamente cationes divalentes, como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Rodríguez-Valera, 1993), mientras que en otros predominan los aniones CO_3^{2-} y Cl^- , dando lugar a masas de agua alcalinas con valores de pH superiores a 8 (Grant & Tindall, 1986).

Las salinas marinas constituyen un ejemplo típico de **ambientes talososalinos**, los cuales además, constituyen un excelente modelo para el estudio de la biodiversidad microbiana y ecología en hábitats con salinidades crecientes. Son numerosos los estudios llevados a cabo en este tipo de sistemas en diversos puntos del planeta (Pašić *et al.*, 2005, 2007, Baati *et al.*, 2008, 2011; Oh *et al.*, 2010; Trigui *et al.*, 2011; Boujelben *et al.*, 2012a, 2012b; Zhaxybayeva *et al.*, 2013; Dillon *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014a; Plominsky *et al.*, 2014; Ballav *et al.*, 2015; Di Meglio *et al.*, 2016; Kambourova *et al.*, 2017; Barghini *et al.*, 2018; Viver *et al.*, 2019; Isaji *et al.*, 2019), siendo probablemente las salinas solares “Bras del Port”, Santa Pola (Alicante), las mejor estudiadas desde el punto de vista microbiológico (Rodríguez-Valera *et al.*, 1981, 1985; Ventosa *et al.*, 1982, 2014; Quesada *et al.*, 1985; Benlloch *et al.*, 1995, 1996, 2001, 2002; Guixa-Boixareu *et al.*, 1996; Antón *et al.*, 1999, 2000; Pedrós-Alió *et al.*, 2000; Casamayor *et al.*, 2000, 2002; Papke *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2010; Ghai *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2014a; Gomariz *et al.*, 2015; Ramos-Barbero *et al.*, 2019). Otros ejemplos de sistemas talososalinos son la mayoría de las cuencas hipersalinas de los fondos marinos, como las denominadas Medee, Bannock y

l'Atalante en el Mediterráneo Oriental y Atlantis II Deep y Discovery Deep en el Mar Rojo (Antunes *et al.*, 2011; Ferrer *et al.*, 2012; Bougouffa *et al.*, 2013; Yakimov *et al.*, 2013; Oren, 2015), así como el Gran Lago Salado en Utah (EE.UU) (Jones *et al.*, 2009), el lago Tyrrell (Australia) (Podell *et al.*, 2014), los lagos Urmía, Meyghan y Aran-Bidgol en Irán (Alipour, 2006; Makhdoumi-Kakhki *et al.*, 2012; Naghoni *et al.*, 2017) y el lago Ocnei en Rumanía (Baricz *et al.*, 2014).

Por otro lado, dentro de los **sistemas acuáticos atalasosalinos** encontramos el Mar Muerto, el cual podríamos considerar el ejemplo mejor conocido de este tipo de ambientes (Volcani, 1940; Nissenbaum, 1975; Oren, 1983, 1988; Arahall *et al.*, 1996; Arahall, 1997; Oren *et al.*, 2005; Oren, 2006c; Bodaker *et al.*, 2010, 2012; Romanovskaia *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2014; Oren, 2015; Jacob *et al.*, 2017), aunque también se encuentran otros como los lagos Vanda y Don Juan, en la Antártida (Siegel *et al.*, 1979; Dickson *et al.*, 2013; Laybourn-Parry & Wadham, 2014; Sumner *et al.*, 2016), los lagos salinos y alcalinos Mono, Big Soda y Soap (EEUU) (Jones *et al.*, 1998; Hawley & Hess, 2014), Magadi (Kenia) (Kambura *et al.*, 2016), Natron (Tanzania) (Yakimov *et al.*, 2001), Wadi An Natrun (Egipto) (Imhoff *et al.*, 1979; Jones *et al.*, 1998), lagos hipersalinos de los Andes (Viver *et al.*, 2018; Galisteo *et al.*, 2019; Portero *et al.*, 2019; Zannier *et al.*, 2019) y algunos otros de India, China o Rusia (Siegel *et al.*, 1979; Imhoff *et al.*, 1979; Upasani & Desai, 1990; Jones *et al.*, 1998; Yakimov *et al.*, 2001; Pagaling *et al.*, 2007; Banciu *et al.*, 2008; Pagaling *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2011; Antony *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2013; Hawley & Hess, 2014; Laybourn-Parry & Wadham, 2014; Paul *et al.*, 2016; Sumner *et al.*, 2016; Vavourakis *et al.*, 2016; Kambura *et al.*, 2016; Timmers *et al.*, 2018).

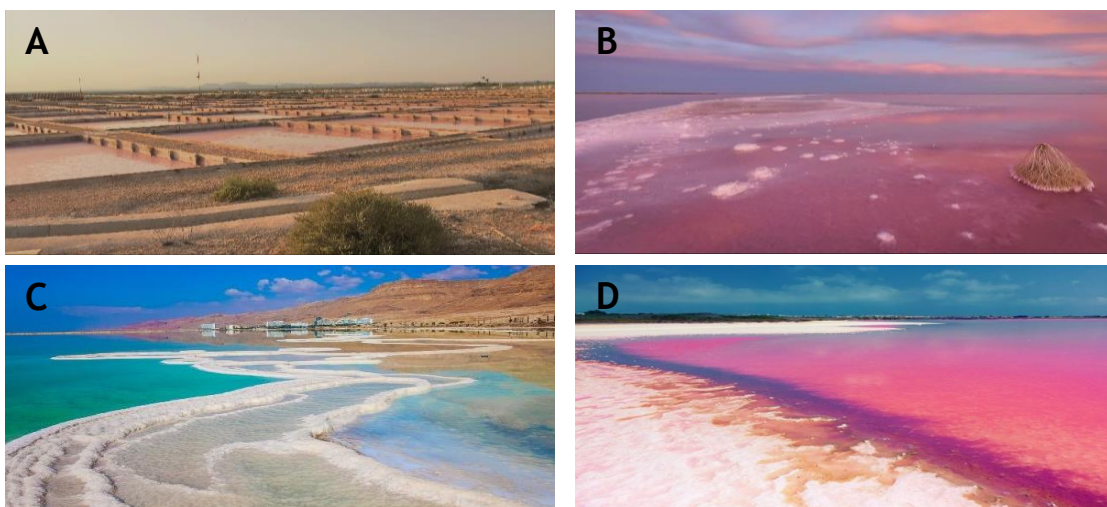


Figura 2. Ejemplos de ambientes hipersalinos talasosalinos: A) salinas de Es Trenc (Mallorca), B) lago Tyrrell (Australia). Ejemplos de ambientes hipersalinos atalasosalinos: C) Mar Muerto (Israel/Jordania), D) lago Natron (Tanzania).

1.2.II. Suelos hipersalinos

Mientras que los sistemas acuáticos han sido extensamente estudiados, los suelos salinos no han sido objeto de tanta atención. Los suelos son el resultado de acciones físicas, químicas y biológicas que se originan por la descomposición de la roca y la acumulación de materia orgánica (Schmidt & Schaechter, 2012; Soil Survey Staff, 2014). Atendiendo a su origen, la salinidad en estos sistemas es muy variable, pudiendo ser el resultado de una salinización primaria (procedente del propio material geológico, de un aporte de agua insuficiente, de bajas tasas de precipitación o de la influencia de las mareas en zonas costeras) o secundaria (debido a acciones antropogénicas: malas prácticas de riego, de fertilización o modificación de los niveles freáticos) (Abrol *et al.*, 1988). La salinidad del suelo suele medirse en un extracto acuoso del mismo, concretamente en el extracto de saturación de suelo (pasta saturada) (Richards, 1954; Rhoades *et al.*, 1999). Puesto que la mayoría de los suelos contienen pequeñas cantidades de sales solubles, sólo se deberían considerar hipersalinos aquellos con una concentración de sales por encima de un cierto límite (Rodríguez-Valera, 1988). Existe una gran diversidad de criterios, y de hecho, no existe una definición precisa de suelo salino o hipersalino. Mientras que para Kaurichev (Kaurichev, 1980), los suelos salinos son aquellos que contienen una concentración de sales solubles por encima del 0,2 % (p/v), el US Soil Laboratory lo define en 4 mS/cm de conductividad eléctrica en pasta saturada (CE_e), el sistema de clasificación taxonómica de suelos coordinado por el Ministerio de Agricultura de EE.UU. (USDA) en 30 mS/cm y la Base Referencial Mundial del Recurso del Suelo (WRB) lo sitúa en 15 mS/cm o bien 8 mS/cm si el pH > 8,5, siendo éste el estándar internacional para la clasificación de suelos (Richards, 1954; IUSS Working Group WRB, 2007).

Como se ha mencionado, los estudios sobre la comunidad microbiana en suelos salinos son más escasos, y se limitan a suelos costeros de España (Quesada *et al.*, 1982, 1983; Garabito *et al.*, 1998), China (Zhao *et al.*, 2018) e Italia (Canfora *et al.*, 2014, 2015), suelos salinos y alcalinos en México, Rusia, Egipto, Mongolia, Armenia y Australia (Sorokin *et al.*, 2008; Valenzuela-Encinas *et al.*, 2008, 2009; Navarro-Noya *et al.*, 2015; de León-Lorezana *et al.*, 2017; Panosyan *et al.*, 2018; Rath *et al.*, 2019), y suelos de interior como el de Rambla Salada en Murcia (Luque *et al.*, 2012, 2014, Oueriaghli *et al.*, 2013, 2014, 2018), Great Salt Plains (Oklahoma, EE.UU.) (Caton *et al.*, 2004, 2009; Walsh *et al.*, 2005), La Sal del Rey (Texas, EE.UU.) (Hollister *et al.*, 2010) o los desiertos salinos del noroeste de China (Ren *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018) y del Kutch en la India (Pandit *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2015; Narayan *et al.*, 2018).

1.2.III. Ambientes hipersalinos estudiados

En esta Tesis Doctoral en concreto, nos hemos centrado en el estudio de ambientes hipersalinos de los dos tipos, tanto acuáticos como terrestres, ubicados todos ellos en la provincia de Huelva, como son las salinas de Isla Cristina y de Isla Bacuta y en un suelo hipersalino localizado en las Marismas del Odiel. A continuación se describen las características de dichos ambientes hipersalinos.

1.2.III.I. Salinas de Isla Cristina

Las salinas costeras de Isla Cristina, se construyeron en el año 1955 para la producción artesanal de sal. Se encuentran situadas cerca de industrias de procesamiento de alimentos pesqueros en la localidad de Isla Cristina, derivado de la enorme demanda de este producto por las mismas, y localizadas dentro del Paraje Natural de Marismas Atlánticas, conocido como Marismas de Isla Cristina, en la desembocadura del río Carreras. Las marismas en general son zonas húmedas, terrenos bajos y pantanosos que se inundan por el agua del mar durante las mareas altas. Constituyen áreas de transición entre ambientes acuáticos y terrestres de alto valor ecológico donde pueden encontrarse una amplia variedad de ambientes hipersalinos.

El drenaje y la aportación de las aguas de estas salinas proviene fundamentalmente del océano Atlántico. A finales de la primavera, los estanques denominados esteros se llenan con la marea alta, el agua de mar pasa por una serie de recintos estancos, de menor a mayor nivel de profundidad para favorecer la caída del agua por la gravedad de desnivel, durante la cual la concentración salina va en aumento hasta que por saturación, cristaliza. Un sistema de compuertas controla el llenado sucesivo de los diferentes compartimentos.

A pesar de no haber sido objeto de tantos estudios como las salinas “Bras del Port”, también se han realizado en este ambiente numerosos estudios de aislamiento y caracterización de diversas especies de bacterias y arqueas (Mota *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 2010; León *et al.*, 2014, 2015, 2016, 2017; López-Hermoso *et al.*, 2018), así como estudios metagenómicos (Fernández *et al.*, 2014b).

1.2.III.II. Salinas de Isla Bacuta

Las salinas de Isla Bacuta, por su parte, han sido menos estudiadas y se reducen a unos pocos estudios de aislamiento de arqueas y bacterias halófilas y caracterización de las comunidades microbianas por métodos independientes de cultivo (León *et al.*, 2014;

Infante-Domínguez et al., 2015; de la Vega et al., 2016; Gómez-Villegas et al., 2018; López-Hermoso et al., 2018). Estas salinas se encuentran también ubicadas en la provincia de Huelva, en este caso en el interior del Paraje Natural Marismas del Odiel, en la isla del mismo nombre entre el canal de la Mojarrera y el río Odiel. Las Marismas del Odiel tienen una superficie de 7184 hectáreas que ocupan casi la totalidad de la desembocadura del río entre las localidades de Huelva, Gibraleón, Aljaraque y Punta Umbría. Se trata de un espacio natural de marismas mareales situado en el estuario de los ríos Tinto y Odiel.

Las salinas de Isla Bacuta hoy en día constituyen además, un reclamo turístico y un espacio de gran interés ornitológico para la observación de flamencos, avefrías, cigüeñas, correlimos, garcillas, garzas reales y espátulas.

I.2.III.III. Suelos hipersalinos en las Marismas del Odiel

Los ciclos mareales en las Marismas del Odiel han dado lugar a la creación de distintos hábitats de marismas en este paraje. Por un lado nos encontramos zonas de inundación periódica o de menor regularidad, denominadas de marisma baja o media, respectivamente; las cuales presentan una salinidad similar a la del agua que inunda el sistema. Por otra parte, se localizan las zonas de marisma alta o madura, cuyos aportes de agua provienen fundamentalmente de procesos de precipitación, ya que solo se inundan durante las mareas vivas equinocciales (Castellanos et al., 1994). En estas zonas más elevadas, la capa de agua subterránea puede caer a profundidades variables por debajo de la superficie, dando lugar a condiciones de elevada salinidad que impiden el desarrollo de plantas (Shen et al., 2018). Esto genera parches desprovistos de vegetación, en ocasiones denominados salitrales, entre masas de vegetación halófila, compuesta de especies como *Spartina densiflora*, *Salicornia ramossisima* y *Sarcocornia* (Castellanos et al., 1994) y de algunos cordones boscosos de pino piñonero y sabina (Plan de Ordenación de Recursos Naturales del Paraje Natural Marismas del Odiel y de las Reservas Naturales Isla de En medio y Marisma de El Burro, 2017).

El estudio de estos suelos desde el punto de vista microbiológico se limita a análisis metagenómicos llevados a cabo recientemente por nuestro grupo de investigación (Vera-Gargallo & Ventosa, 2018a; Vera-Gargallo et al., 2018, 2019).



Figura 3. Ambientes hipersalinos estudiados: **A)** salinas de Isla Cristina (Huelva), **B)** salinas de Isla Bacuta (Huelva), **C-D)** suelos salinos localizados en las Marismas del Odiel (Huelva).

I.2.IV. Microorganismos halófilos

I.2.IV.I. Concepto y clasificación

Etimológicamente, el término “halófilo” proviene del griego (*hals*, sal, y *phil*, amor o amigo), que se traduce como “amigo o amante de la sal” y hace referencia a la necesidad fisiológica de algunos seres vivos de altas concentraciones de sales para crecer óptimamente. Asimismo, se han descrito otros organismos, denominados halotolerantes, capaces de resistir elevadas concentraciones de sal, aunque éstas no son requeridas para su crecimiento óptimo (Kushner, 1978).

Aunque a lo largo de los años se han propuesto varias clasificaciones para acomodar las relaciones de los diferentes microorganismos con la sal (Trüper & Galinski, 1986; Vreeland, 1987; Ramos-Cormenzana, 1989), la más extensamente aceptada es la propuesta por Kushner y Kamekura en 1988 (Kushner & Kamekura, 1988). Esta clasificación divide a los

microorganismos en varias categorías en función de la concentración de cloruro sódico requerida para su crecimiento óptimo:

- **No halófilos:** aquellos que crecen óptimamente en medios con menos de 1 % (p/v) de NaCl (aproximadamente 0,2 M). En este grupo se incluyen los microorganismos halotolerantes. Si éstos soportan concentraciones de NaCl superiores al 15 % (p/v) (aproximadamente 2,5 M), se denominan halotolerantes extremos.
- **Halófilos débiles:** poseen crecimiento óptimo en medios con un contenido en NaCl entre 1 y 3 % (p/v) (aproximadamente de 0,2 a 0,5 M). Aquí se incluyen los microorganismos marinos.
- **Halófilos moderados:** se desarrollan óptimamente en medios entre un 3 y un 15 % (p/v) de NaCl (aproximadamente entre 0,5 y 2,5 M).
- **Halófilos extremos:** su crecimiento óptimo es en medios que contienen al menos un 15 % (p/v) de NaCl, pudiendo incluso crecer hasta la saturación de sales, alrededor de un 32 % (p/v) de NaCl (entre 2,5-5,2 M, aproximadamente).

Estos últimos, los microorganismos halófilos moderados y extremos son los más abundantes en los ambientes hipersalinos, especialmente a salinidades superiores a 1,5 M de NaCl. Concretamente, a concentraciones salinas intermedias (entre 1,5-3,0 M), predominan las bacterias halófilas moderadas y algunas haloarqueas, mientras que, en ambientes de salinidad superior a 3,0 M, abundan las haloarqueas y las bacterias halófilas extremas (Ventosa, 2006; Ventosa *et al.*, 2015).

Por otro lado, aunque el cloruro sódico sea la sal más abundante en la mayoría de los ambientes hipersalinos del planeta (Fox-Powell *et al.*, 2016), otras sales e iones pueden ser tolerados o requeridos para el desarrollo óptimo de los microorganismos, como el Mg^{2+} o el Ca^{2+} (Savage *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2015; Kalwasińska *et al.*, 2019). Asimismo, la necesidad de nutrientes o factores de crecimiento específicos además de otras condiciones como la temperatura de incubación, el pH, el nivel de oxígeno o la concentración de nutrientes en el medio, puede afectar al crecimiento óptimo de los microorganismos (Forsyth & Kushner, 1970; Post, 1977; Köpke *et al.*, 2005).

1.2.IV.II. Filogenia y taxonomía

A pesar de las extremas condiciones fisicoquímicas a las que están sometidos los ambientes hipersalinos, en ellos podemos encontrar representantes de los tres dominios del árbol de la vida (Oren, 2008).

I.2.IV.II.1. Arqueas

Dentro del dominio *Archaea*, encontramos el phylum *Euryarchaeota* al que pertenecen las arqueas halófilas extremas, denominadas haloarqueas, encuadradas a su vez en la clase *Halobacteria* (Oren et al., 2017). Estos microorganismos son los componentes mayoritarios de la biomasa microbiana que se encuentra en los ambientes hipersalinos extremos, especialmente a concentraciones superiores al 20 % de NaCl, por lo que son considerados los microorganismos halófilos extremos por excelencia (Ventosa et al., 2014, 2015). Algunos de los géneros más conocidos dentro de este grupo y que constituyen una proporción importante de la población a altas salinidades, son *Haloquadratum* o *Halorubrum*, entre otros (Ventosa et al., 2014). Recientemente también han sido descritas diversas arqueas halófilas moderadas e incluso haloarqueas capaces de crecer en ambientes con bajas concentraciones de sales (Oren, 2006b).

Hasta muy recientemente la clase *Halobacteria* estaba constituida por un único orden, *Halobacteriales* (Grant et al., 2001), y por una única familia, *Halobacteriaceae* (Tindall, 1992; Grant et al., 2001a; Oren, 2006a), aunque actualmente la clase *Halobacteria* se subdivide en tres órdenes diferentes: *Natrialbales*, *Haloferacales* y *Halobacteriales*, que incluyen una (*Natrialbaceae*), dos (*Haloferacaceae* y *Halorubraceae*) y tres (*Halobacteriaceae*, *Halococcaceae* y *Haloarculaceae*) familias, respectivamente (Gupta et al., 2015, 2016; Amoozegar et al., 2017; Oren et al., 2017) (Figura 4). Se trata de una clase muy extensa,

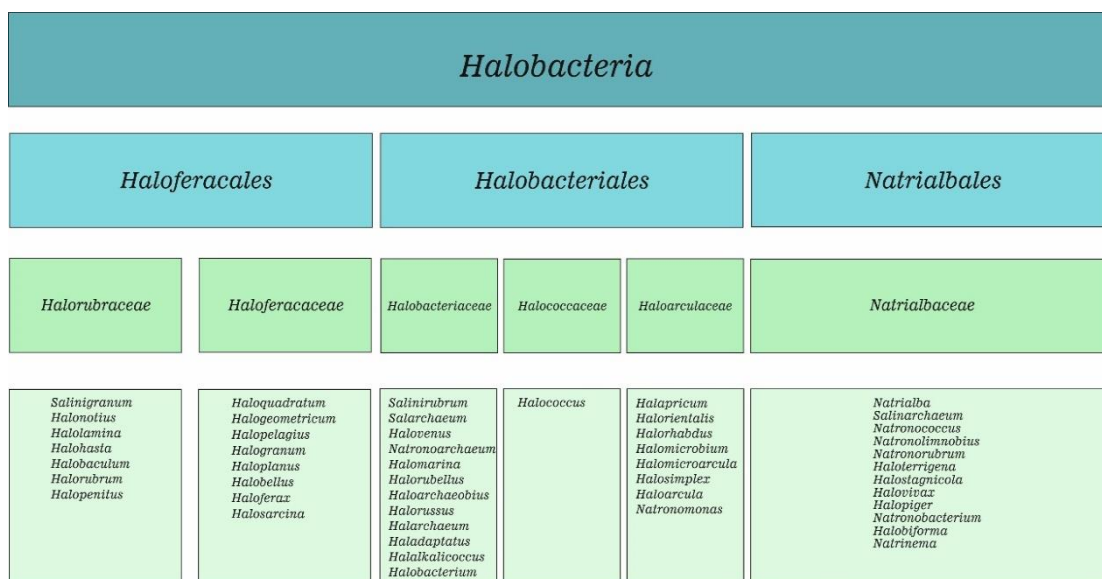


Figura 4. Esquema de los distintos órdenes, familias y géneros de la clase *Halobacteria* (adaptado de Amoozegar et al., 2017).

donde hasta las últimas revisiones, incluyen más de 57 géneros y 233 especies distintas (de la Haba et al., 2011; Parte, 2014; Gupta et al., 2015; Arahall et al., 2017).

Dentro del phylum *Euryarchaeota*, aunque en menor proporción que las haloarqueas, también encontramos un número reducido de arqueas metanógenas halófilas, las cuales hasta la fecha, se engloban dentro de cinco géneros de las clases *Methanomicrobia* (*Methanohalobium*, *Methanohalophilus* y *Methanosalsum* del orden *Methanosarcinales*, y *Methanocalculus* del orden *Methanomicrobiales*) y “*Methanonatronarchaeia*” (“*Methanonatronarchaeum thermophilum*”) (de la Haba et al., 2011; Sorokin et al., 2017, 2018a; Ferrer et al., 2018).

Durante mucho tiempo todas las arqueas halófilas aisladas en cultivo puro pertenecían al phylum *Euryarchaeota*. No ha sido hasta muy recientemente cuando el grupo de las nanohaloarqueas, pertenecientes al superphylum “DPANN”, ha conseguido ser cultivado (Hamm et al., 2019). Este grupo de arqueas halófilas, relacionadas con la clase *Halobacteria*, ha suscitado gran interés por parte de la comunidad científica desde que por métodos independientes de cultivo se puso de manifiesto su existencia en diversos ambientes hipersalinos (Grant et al., 1999; Casanueva et al., 2008; Ghai et al., 2011; Narasingarao et al., 2012; Zhaxybayeva et al., 2013; Baricz et al., 2014; Martínez-García et al., 2014; Gomariz et al., 2015; Di Meglio et al., 2016; Vavourakis et al., 2016; Rubin et al., 2017; Finstad et al., 2017; Vogt et al., 2018). Se trata de un grupo de arqueas halófilas con bajo contenido en G+C y de tamaño muy pequeño (0,3-1 µm). Aunque algunos estudios sugerían que pudiera tratarse de entidades de vida libre (Narasingarao et al., 2012), se ha descrito que poseen un carácter simbiote y que necesitan asociarse a un hospedador, ya que carecen de la maquinaria necesaria para llevar a cabo los procesos metabólicos indispensables para la vida como la síntesis de lípidos, aminoácidos, nucleótidos o cofactores (Hamm et al., 2019). Asimismo, también se ha propuesto que las nanohaloarqueas poseen una diversidad filogenética similar a la ya descrita para las haloarqueas (Narasingarao et al., 2012; DeMaere et al., 2013). Hasta la fecha, aunque la única nanohaloarquea cultivada, *Candidatus Nanohaloarchaea antharticus*, se encuentra asociada a *Halorubrum lacusprofundi* como hospedador, se estima que los otros posibles géneros de “Nanohaloarchaeota” existentes, se asocien específicamente a otros grupos de haloarqueas abundantes en los ambientes hipersalinos (Hamm et al., 2019).

I.2.IV.II.2. Bacterias

Dentro de las bacterias halófilas encontramos una gran variedad de taxones, los cuales, a su vez, conforman un grupo muy heterogéneo de microorganismos caracterizados por una gran diversidad de actividades metabólicas (desde fotótrofas a heterótrofas), respiración (aerobia o anaerobia), composición de la pared celular y morfología (Oren, 2002; Ventosa, 2006; de la Haba et al., 2011).

Dentro de este grupo podemos encontrar representantes tanto halófilos moderados como extremos, englobados en diferentes ramas filogenéticas: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Thermotogae* y *Verrucomicrobia* (de la Haba et al., 2011). Estos phyla no son exclusivos de especies halófilas, contienen además otros representantes no halófilos o halotolerantes.

A diferencia de las haloarqueas, la mayoría de las bacterias halófilas se encuentran adaptadas a salinidades más bajas (10-20 % NaCl), siendo representantes de los géneros *Halomonas*, *Chromohalobacter* o *Salinivibrio* algunos ejemplos de bacterias halófilas moderadas más frecuentemente aislados en el laboratorio mediante métodos tradicionales de cultivo, o el género *Spiribacter* uno de los más abundantes en estos ambientes a salinidades intermedias (Ventosa et al., 2014). Existen también algunos ejemplos de bacterias con requerimientos más elevados de sales. Sin duda los ejemplos mejor conocidos en ambientes hipersalinos son los géneros *Salinibacter* y *Salinivenus* (clase *Rhodothermaeota*) (Antón et al., 2017; Viver et al., 2018), aunque también encontramos otras especies como *Actinopolyspora halophila* (clase *Actinobacteria*) (Gochbauer et al., 1975), *Halorhodospira halophila* (reclasificada como *Ectothiorhodospira halophila*) (Hirschler-Réa et al., 2003), *Ectothiorhodospira halochloris* (Imhoff & Trüper, 1977), *Halovibrio denitrificans*, *Halospina denitrificans* (Sorokin et al., 2006), todas ellas en la clase *Gammaproteobacteria*, y por último *Halanaerobium lacusrosei* (Cayol et al., 1995); *Acetohalobium arabaticum* (Zhilina & Zavarzin, 1990) o *Halobacteroides lacunaris* (Zhilina et al., 1991), del phylum *Firmicutes*.

I.2.IV.II.3. Eucariotas

Si bien la población mayoritaria en ambientes hipersalinos son procariotas, también encontramos en menor medida algunos organismos del dominio *Eukarya*, fundamentalmente a salinidades más bajas (Ventosa, 2006). Los ejemplos más conocidos de eucariotas halófilos son el crustáceo *Artemia salina* y el alga unicelular *Dunaliella*. Esta última constituye el principal productor primario en los ambientes hipersalinos acuáticos

(Stephens & Gillespie, 1976; Post, 1977; Javor, 1989; Oren, 2005, 2014), donde además es capaz de alcanzar densidades poblacionales elevadas incluso en ambientes acuáticos conteniendo hasta un 30 % de sales totales (Rodríguez-Valera *et al.*, 1985). *Dunaliella* posee gran valor biotecnológico, gracias a su capacidad para acumular grandes cantidades de beta-carotenos, lo que además contribuye a proporcionar la coloración rojiza característica de los ambientes hipersalinos donde se encuentra (Oren, 2005).

Por otro lado, aunque en una proporción más reducida, en los ambientes hipersalinos podemos encontrar otros eucariotas como larvas de la mosca del género *Ephydra*, el alga flagelada fotosintética *Asteromonas gracilis*, hongos filamentosos de los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Gymnascella*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Ulocladium* o *Wallemia*; levaduras halófilas y halotolerantes como *Aureobasidium pullulans*, *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodospiridium sphaerocarpum*, *Rhodospiridium babjevae*, *Rhodotorula laringes*, *Trimmatostroma salinum* y *Yarrowia lipolytica*, así como varios tipos de protozoos ciliados y flagelados (Cho, 2005; Butinar *et al.*, 2005a, 2005b, 2005c; Ventosa, 2006; Triadó-Margarit & Casamayor, 2013; Jančič *et al.*, 2015, 2016; Martinelli *et al.*, 2017; Gostinčar *et al.*, 2019).

I.2.IV.II.4. Virus

Los virus constituyen las entidades biológicas más diversas y abundantes del planeta, estimándose alrededor de 10^{31} virus en todo el mundo (Breitbart & Rohwer, 2005), lo que resulta en un orden de magnitud mayor al número de células procariotas totales (Kallmeyer *et al.*, 2012). Curiosamente, los ambientes hipersalinos presentan las mayores concentraciones de partículas similares a virus por mililitro (VLP/mL) y de ratios virus/célula, alcanzándose hasta 10^{10} VLP/mL y ratios superiores a los 100 virus/célula (Santos *et al.*, 2012). Atendiendo a su morfología, se han descrito principalmente cuatro tipos diferentes: cabeza-cola, esféricos, filamentosos y fusiformes (en forma de huso o limón) (Santos *et al.*, 2012), aunque otro tipo de morfologías poco frecuentes también han sido observadas en un estudio del lago Retba, Senegal (Sime-Ngando *et al.*, 2011). Los genomas de estos virus presentan un rango de tamaño que varía desde 10 hasta 533 kb (Santos *et al.*, 2012).

En los ambientes hipersalinos se observa como la comunidad vírica varía de forma paralela con la comunidad celular en función del gradiente de salinidad, de tal forma que, a medida que aumenta la salinidad, la concentración vírica se incrementa desde los 10^7 VLP/mL del agua de mar (3,5 % de salinidad) (Wigington *et al.*, 2016) hasta los 10^{10} VLP/mL que se

pueden encontrar en ambientes con salinidades superiores al 30 % (Guixa-Boixareu et al., 1996; Santos et al., 2012). Asimismo, la morfología de los virus también varía acorde a los cambios de salinidad, siendo los fusiformes en tipo de huso poco abundantes a bajas salinidades pero alcanzando concentraciones de hasta el 25 % en cristalizadores de salinas mediterráneas (Guixa-Boixareu et al., 1996) e incluso hasta el 46 % en el lago Retba (Sime-Ngando et al., 2011). Por otro lado, la diversidad en el tamaño de los genomas víricos se reduce al incrementar la salinidad (Díez et al., 2000; Sandaa et al., 2003; Santos et al., 2007), donde a salinidades comprendidas entre el 4-15 % de NaCl, el tamaño de los genomas víricos oscila entre 32 y 533 kb; a salinidades entre el 15 y el 20 %, entre 32 y 63 kb; mientras que a salinidades superiores del 20 % hasta la saturación de NaCl, se observa principalmente una banda de 37 kb.

Cabe destacar la importancia de los virus en el control poblacional de las comunidades microbianas en estanques cristalizadores, ya que a salinidades superiores al 25-30 % no se encuentran eucariotas bacteriótrofos, y por lo tanto son los virus los únicos agentes biológicos responsables del control poblacional (Guixa-Boixareu et al., 1996).

A pesar de la enorme cantidad de virus presentes en los ambientes hipersalinos, solo ha sido posible cultivar alrededor de 100 fagos, la mayoría de ellos infectando a especies del phylum *Euryarchaeota* como *Halorubrum*, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natrialba* y *Natrinema* (Atanasova et al., 2012, 2015, 2018; Demina et al., 2016, 2017; Fu et al., 2016; Dyll-Smith et al., 2019; Mizuno et al., 2019). Sorprendentemente, hasta la fecha no se ha podido cultivar ningún virus relacionado con la haloarquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi* o del phylum *Nanoarchaeota*, microorganismos dominantes en muchos ambientes hipersalinos, aunque si se ha podido obtener información sobre estos virus mediante clonaje en fósmidos o *single cell genomics* (García-Heredia et al., 2012; Martínez-García et al., 2014). En lo que respecta a virus de bacterias halófilas, apenas 20 bacteriófagos han podido ser aislados en cultivo los cuales infectan a especies de géneros como *Halomonas*, *Salicola*, *Salinivibrio* o *Salinibacter* (Kauri et al., 1991; Seaman & Day, 2007; Kukkaro & Bamford, 2009; Villamor et al., 2018). Tampoco se han aislado ni identificado virus del alga *Dunaliella salina* ni de hongos halófilos.

La mayoría de los virus cultivados, independientemente de si infectan bacterias o arqueas halófilas, presentan morfología de cabeza-cola, aunque también se han aislado algunos virus de arqueas con morfología pleomórfica y de tipo limón (Atanasova et al., 2015).

I.2.IV. III. Mecanismos de osmoadaptación

Las elevadas concentraciones de sal a las que se encuentran expuestos los microorganismos que habitan en los ambientes hipersalinos, ha propiciado el desarrollo de diferentes estrategias que les permitan obtener el balance osmótico necesario no sólo para vivir en estas condiciones, sino también para poder adaptarse a los posibles cambios bruscos de las mismas.

Dado que la mayoría de las membranas biológicas son permeables al agua, no es posible el desarrollo de ningún mecanismo basado en el bombeo activo de agua a través de éstas ante los cambios de osmolaridad en el medio externo, y por tanto, son necesarias otras adaptaciones para mantener la alta presión osmótica intracelular. Básicamente los microorganismos halófilos presentan dos estrategias; la denominada *salt-in*, que se caracteriza por la acumulación de iones inorgánicos en el interior celular, y la denominada *salt-out*, donde éstos se expulsan al exterior y en su lugar se compilan compuestos orgánicos denominados solutos compatibles (Gunde-Cimerman et al., 2018).

Los microorganismos que utilizan el mecanismo de osmorregulación *salt-in* acumulan fundamentalmente K^+ en el interior celular, mientras que el Na^+ es expulsado en la medida de lo posible de la célula, dado el carácter tóxico que supone para ésta cuando se encuentra a elevadas concentraciones (Carden et al., 2003; Munns & Tester, 2008). El ion Cl^- por su parte, es el anión importado por excelencia. Se estima que las concentraciones de K^+ en el citosol oscilan entre 300 y 500 mM en organismos procariotas no halófilos, y que éstas alcanzan valores superiores a 1 M en los microorganismos que habitan en ambientes hipersalinos (Epstein, 2003; Gunde-Cimerman et al., 2018); mientras que por su parte el Na^+ se reduce hasta un tercio de la concentración externa (Gunde-Cimerman et al., 2018). Algunos autores indican que la acumulación preferencial de K^+ se encuentra relacionada con la compatibilidad de este ion con el agua y con la estructura de las proteínas incluso a altas concentraciones, dado su radio iónico, la magnitud del campo eléctrico en su superficie y la estructura de su capa de hidratación (Eisenman, 1961; Clarkson & Hanson, 1980).

El movimiento de iones a través de la membrana para poder alcanzar las concentraciones intracelulares necesarias requiere de mecanismos de transporte activo. La energía exigida para ello procede del gradiente de protones generado en la respiración a través de la cadena transportadora de electrones o de las bombas de protones de las bacteriorrodopsinas dependientes de la luz. El Na^+ puede ser excluido de la célula por medio de sistemas antiportadores Na^+/H^+ , mientras que el K^+ puede atravesar

pasivamente la membrana, a través de canales a favor de gradiente eléctrico, aunque también se han descrito otros sistemas de transporte de K^+ dependientes de energía (Gunde-Cimerman et al., 2018). Al igual que en el caso del metabolismo, los avances en el análisis genómico han mostrado que existe una diversidad considerable de transportadores de potasio en arqueas halófilas (Jensen et al., 2015), algunos de los cuales se muestran en la Tabla 2. La acumulación del anión Cl^- puede producirse por cotransporte con Na^+ o mediante la proteína halorrodopsina, un canal de cloruros que emplea la luz solar para importar este ion al citoplasma (Duschl & Wagner, 1986; Gunde-Cimerman et al., 2018).

Tabla 2. Tipos de transportadores implicados en el mecanismo de osmoadaptación *salt-in* de la clase *Halobacteria* (adaptado de Jensen et al., 2015).

Transportador	Función	Especie identificada
NapA	Antiportador Na^+/H^+	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.
Nha	Antiportador Na^+/H^+	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.
Trk	Simportador K^+/H^+	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.
Kdp	ATPasa transportadora de K^+	<i>Halobacterium</i> sp.
Mth	Canal de K^+ dependiente de Ca^{2+}	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.
Pch	Canal de K^+	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.
Nad	Simportador Na^+/Cl^-	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.
Nac	Simportador Na^+/Cl^-	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.
Halorrodopsina	Halorrodopsina para el transporte de Cl^-	<i>Haloarcula marismortui</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Halobacterium</i> sp.

La mayoría de los microorganismos con estrategia *salt-in* son halófilos extremos, requieren al menos un 15-20 % (p/v) de sal para crecer y su crecimiento se encuentra muy limitado a salinidades inferiores. Las arqueas de la clase *Halobacteria* son los microorganismos con una estrategia de tipo *salt-in* por excelencia, siendo concretamente *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii* y *Haloarcula marismortui* los organismos

modelo para el estudio de adaptaciones osmóticas dentro de este grupo (Youssef *et al.*, 2014). Otros microorganismos halófilos conocidos con estrategia *salt-in* son las arqueas metanógenas de la clase “*Methanonatronarchaeia*”, las bacterias pertenecientes al orden *Halanaerobiales*, el género *Salinibacter* y la especie bacteriana fotótrofa *Halorhodospira halophila* (Raymond & Sistrom, 1969; Antón *et al.*, 2002; Elevi Bardavid & Oren, 2012a; Deole *et al.*, 2013; Sorokin *et al.*, 2017; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

Para adaptarse a las altas concentraciones iónicas que se acumulan en el citoplasma ante los cambios de salinidad del ambiente, los microorganismos halófilos con esta estrategia requieren una serie de adaptaciones enzimáticas, lo que limita el rango salino en el que estos pueden vivir (Lanyi, 1974; Oren, 2008; Deole *et al.*, 2013). Los microorganismos *salt-in* se caracterizan por presentar un proteoma fundamentalmente ácido con un mayor predominio de aminoácidos cargados negativamente (aspartato, glutamato), así como de aminoácidos hidrofóbicos (fenilalanina, isoleucina, leucina), frente a los básicos (lisina y arginina) y los menos hidrofóbicos (glicina, alanina, serina y treonina) (Kastiris *et al.*, 2007; DasSarma & DasSarma, 2015). La superficie cargada negativamente hace a las proteínas más solubles y flexibles a las condiciones de alta salinidad, en las cuales las de los microorganismos no halófilos se agregarían, volviéndose más rígidas y finalmente precipitando (Elcock & McCammon, 1998; Bolhuis, 2002; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

Los microorganismos con estrategia *salt-out* por su parte, se caracterizan por expulsar estas sales iónicas desde el citoplasma al exterior celular para conseguir lidiar con las concentraciones salinas del medio externo. Para ello, acumulan moléculas no iónicas altamente solubles en agua y de bajo peso molecular denominadas solutos compatibles, sin que se produzcan en este caso, cambios en la actividad enzimática de la célula, aportándoles una mayor flexibilidad que les permite adaptarse a un rango de salinidades mucho más amplio que los organismos con estrategia *salt-in*. En algunos extremófilos además, estos compuestos no solo les permiten adaptarse a las concentraciones salinas, sino también a otras situaciones de estrés ambiental como cambios bruscos de temperatura. Dada la versatilidad de esta estrategia de osmoadaptación y a pesar de que la síntesis *de novo* de estos compuestos es un proceso energéticamente más costoso que la estrategia *salt-in*, este mecanismo es el más extendido en los tres dominios de la vida (Oren, 1999, 2008).

Se han descrito diferentes compuestos orgánicos que pueden actuar como solutos compatibles, entre los que se encuentran polioles, azúcares, aminoácidos, betaínas, ectoínas, diaminoácidos N-acetilados o carboxamidas N-derivadas de la glutamina

(Galinski, 1993, 1995; da Costa *et al.*, 1998; Kempf & Bremer, 1998; Martin *et al.*, 1999; Roberts, 2005). Un mismo microorganismo puede acumular diferentes tipos de solutos compatibles empleando uno u otro en función de las condiciones externas (Oren *et al.*, 2009; Czech & Bremer, 2018). La acumulación intracelular de estos compuestos puede ser el resultado de la síntesis *de novo* o del transporte desde el exterior a través de proteínas específicas de alta afinidad (Nau-Wagner *et al.*, 1999; Hoffmann *et al.*, 2013). Cuando la salinidad descende, estos compuestos son excretados al exterior a través de canales mecanosensitivos o bien son catabolizados, es decir, descompuestos gracias a la acción de enzimas específicas, para su posterior utilización como fuente de carbono y/o energía (Czech & Bremer, 2018; Czech *et al.*, 2018). Si la salinidad vuelve a aumentar, algunos de estos microorganismos pueden acumular de manera transitoria iones inorgánicos hasta la síntesis de nuevos solutos compatibles (Wood *et al.*, 2001).

Este mecanismo de osmoadaptación es el más extendido entre los microorganismos halófilos moderados y halotolerantes, siendo la estrategia utilizada por los eucariotas halófilos y por la gran mayoría de las bacterias halófilas. El glicerol y otros polioles son generalmente empleados por protistas, algas y hongos, mientras que las bacterias fundamentalmente utilizan la ectoína y la glicina betaína (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Por otro lado, aunque las haloarqueas han sido tradicionalmente descritas como un grupo coherente de microorganismos *salt-in*, recientemente también se ha visto que miembros de la clase *Halobacteria* son capaces de sintetizar trehalosa y acumular algunos solutos compatibles, como la glicina betaína, la ectoína y la prolina (Anderson *et al.*, 2011; Becker *et al.*, 2014; Youssef *et al.*, 2014). El transporte de solutos compatibles, no obstante, no implica el uso del mecanismo *salt-out*, ya que, como se ha mencionado, estos compuestos pueden servir como fuente de carbono y nitrógeno o como termoprotectores (Holtmann & Bremer, 2004; Tschapek *et al.*, 2011; Orellana *et al.*, 2013).

Además, las variaciones de salinidad en el medio externo provocan cambios en la composición lipídica de la membrana de la célula. En bacterias halófilas y halotolerantes, principalmente disminuye la proporción de lípidos neutros de tipo fosfatidiletanolamina, mientras que se incrementa la cantidad de lípidos aniónicos como fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipinas (Russell & Kogut, 1985; Russell, 1989; Sutton *et al.*, 1991; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Los estudios llevados a cabo en haloarqueas, por su parte, son mucho menos numerosos. Entre los efectos observados destaca la formación de cardiolipinas a expensas de fosfatidilglicerol (PG), un descenso en el contenido de fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me) y un aumento del contenido de lípidos C₂₅C₂₀ a expensas de los C₂₀C₂₀ (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018).

I.2.IV.IV. Potencial biotecnológico

Las aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos son muy variadas y han resultado de gran interés en diversos procesos industriales, dada la plasticidad metabólica de estos microorganismos y su capacidad para adaptarse a las condiciones ambientales extremas de los ecosistemas en los que habitan. Algunos de los procesos en los que estos microorganismos intervienen en la industria alimentaria se conocen desde la antigüedad, como el proceso de obtención de la sal común mediante salinas solares, la producción de alimentos fermentados (salsas de pescado o de soja típicas de países asiáticos), los salazones o las aceitunas de mesa (Sinsuwan *et al.*, 2008; Oren, 2010a; Abriouel *et al.*, 2011; Lucena-Padrós & Ruiz-Barba, 2016; Medina *et al.*, 2016; Park & Park, 2016)

Son numerosas las aplicaciones biotecnológicas que presentan las enzimas de las haloarqueas, desde su empleo en la industria alimentaria, la textil o la papelera, hasta su uso en el desarrollo de la biomedicina, la industria farmacéutica o la producción de detergentes (Rao *et al.*, 1998; Tanuja *et al.*, 2000; Beg *et al.*, 2001; Eichler, 2001; Elms *et al.*, 2003; Gomes & Steiner, 2004; Hutcheon *et al.*, 2005; Najafi *et al.*, 2005; Sukumaran *et al.*, 2005; Hatori *et al.*, 2006; Butt *et al.*, 2008; Ozcan *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2009; Souza & Magalhães, 2010; Wang *et al.*, 2010; Fu & Kim, 2010; Hung *et al.*, 2011; Bajpai *et al.*, 2015; Amoozegar *et al.*, 2017). Asimismo, se han descrito otros usos de las haloarqueas, como su papel en procesos de biorremediación, la síntesis de polímeros para la producción de plásticos biodegradables o mejorar los procesos de recuperación de petróleo, el uso de las bacteriorodopsinas en terapia génica u optoelectrónica, o el de las halocinas en la industria textil (Fernandez-Castillo *et al.*, 1986; Rodriguez-Valera, 1992; Ding & Lai, 2010; Poli *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2012; Bott *et al.*, 2013; Srivastava & Kowshik, 2015; Wang *et al.*, 2015; Charlesworth & Burns, 2015; Pecher *et al.*, 2016; Amoozegar *et al.*, 2017, 2019; Ashwini *et al.*, 2017; Malik & Furtado, 2019; Menasria *et al.*, 2019).

Por otro lado, las bacterias halófilas moderadas también poseen un enorme potencial, dado su mecanismo de adaptación a la salinidad del ambiente y a su capacidad para sintetizar solutos compatibles. Destaca la aplicación industrial de la ectoína como estabilizador de enzimas y productos cosméticos (Graf *et al.*, 2008; Czech *et al.*, 2018) a partir de *Halomonas elongata* y *Marinococcus* (Oren, 2002). Otras aplicaciones de la ectoína que se están investigando son el efecto contrarrestante de la luz ultravioleta sobre la piel (Buenger & Driller, 2004), la inhibición de la agregación y la neurotoxicidad de las placas β -amiloideas y su papel en la enfermedad de Alzheimer (Kanapathipillai *et al.*, 2005) y en otras patologías por mal plegamiento de proteínas (Furusho *et al.*, 2005). También se han

realizado ensayos clínicos con ectoína para el tratamiento de la dermatitis atópica leve o moderada (Marini et al., 2014) y se estima que pueda resultar de gran utilidad en procesos de biología molecular como PCRs y *microarrays* de ADN (Mascellani et al., 2007).

Otra utilidad biotecnológica de los microorganismos halófilos es la producción de polímeros de interés económico, como son los exopolisacáridos. Estos compuestos tienen un enorme interés en campos como la medicina, la farmacia, la industria cosmética, alimentaria o petrolífera, donde se utilizan como agentes gelificantes o emulsionantes (Freitas et al., 2011). La empresa LIPOTEC por ejemplo, utiliza exopolisacáridos producidos por bacterias halófilas moderadas para desarrollar productos cosméticos (Soley, 2013). Algunos microorganismos halófilos considerados para su explotación industrial por la producción de estos compuestos en grandes cantidades son *Haloferax mediterranei*, varias especies de los géneros *Halomonas*, *Idiomarina* y *Chromohalobacter*, y la cianobacteria *Aphanothece halopytica* (Béjar et al., 1998; Arias et al., 2003; Llamas et al., 2006, 2012; Mata et al., 2006, 2008; Oren, 2010; Radchenkova et al., 2018).

Por otra parte, entre los eucariotas halófilos destaca el alga halófila *Dunaliella salina* por la producción de β -caroteno, el cual es extensamente utilizado industrialmente como antioxidante, como colorante alimentario y como fuente de provitamina A (retinol) (Ma'Or et al., 2000; Oren, 2002, 2005).

I.2.V. Ecología y biodiversidad

Los numerosos estudios llevados a cabo en los ambientes hipersalinos acuáticos y terrestres, han permitido conocer la diversidad microbiana que habita en los mismos, especialmente en los últimos años con los avances recientes en las técnicas de secuenciación masiva (Oren, 2015; Ventosa et al., 2015).

I.2.V.I. Ecología y biodiversidad en ambientes acuáticos

Las salinas solares constituyen excelentes modelos para el estudio de la biodiversidad y ecología de microorganismos a diferentes concentraciones de sales gracias al sistema de estanque múltiple, donde la salinidad varía desde aquellos con menor cantidad de sales (concentradores) a los estanques donde precipita la sal por evaporación del agua del mar (cristalizadores). Es por eso que se han realizado un elevado número de estudios en diferentes salinas solares localizadas a lo largo de la geografía (Benlloch et al., 1996, 2001; Sandaa et al., 2003; Pašić et al., 2005, 2007; Pedrós-Alió, 2005; Baati et al., 2008, 2011; Oh et al., 2010; Ghai et al., 2011; Trigui et al., 2011; Boujelben 2012a, 2012b; Dillon et al., 2013;

Zhaxybayeva et al., 2013; Fernández et al., 2014a; Plominsky et al., 2014; Gomariz et al., 2015a, 2015b; Mutlu & Güven, 2015; Ventosa et al., 2015; Ballav et al., 2015; Di Meglio et al., 2016; Kambourova et al., 2017; Mora-Ruiz et al., 2018; Barghini et al., 2018; Viver et al., 2019), tanto en estanques cristalizadores como de salinidad intermedia.

Probablemente las salinas solares “Bras del Port”, localizadas en Santa Pola (Alicante), pueden ser consideradas las mejor conocidas desde el punto de vista microbiológico, dados los numerosos estudios tanto dependientes de cultivo como independientes al mismo, realizados en éstas (Ventosa et al., 2014). Algunos ejemplos de microorganismos descritos, aislados a partir de estas salinas son los géneros bacterianos *Chromohalobacter* (Ventosa et al., 1989), *Salinicoccus* (Ventosa & Márquez, 1990), *Salinivibrio* (Mellado et al., 1996), la bacteria halófila extrema *Salinibacter ruber* (Antón et al., 2002), los géneros de haloarqueas *Haloferax*, *Haloarcula* (Torreblanca et al., 1986) y la haloarquea cuadrada *Haloquadratum walsbyi* (Bolhuis et al., 2004; Burns et al., 2007). Asimismo, estudios basados en técnicas moleculares como PCR, DGGE y FISH llevados a cabo en estas salinas mostraron que la diversidad microbiana en estanques cristalizadores era muy reducida, perteneciendo en su mayoría al dominio *Archaea*, y que además, los miembros de esta comunidad frecuentemente aislados en el laboratorio constituían solo un mínimo porcentaje de los microorganismos que allí se encuentran (Benlloch et al., 1996, 2001; Antón et al., 1999, 2000). Por otro lado, se determinó que la población procariota a salinidades intermedias estaba compuesta principalmente por representantes de la clase *Gammaproteobacteria*, del phylum *Bacteroidetes* y de la clase *Halobacteria*, así como también se detectaron numerosas secuencias no relacionadas con ningún microorganismo cultivado (Benlloch et al., 2002; Casamayor et al., 2002).

Posteriormente, estudios metagenómicos en diferentes estanques de estas salinas (al 13, 19, 33 y 37 % salinidad), permitieron corroborar estos datos y analizar con mayor precisión las comunidades microbianas de este sistema. El análisis de las secuencias relacionadas con el gen ARNr 16S de las distintas bases de datos mostró que la población microbiana dominante al 37 % de sales estaba constituida principalmente por representantes de los géneros *Haloquadratum* (79 %) y *Salinibacter* (9 %), seguidos de otros como *Halorubrum*, *Halorhabdus*, *Haloferax*, *Halosimplex* y *Halobacterium* (Ghai et al., 2011), mientras que, a salinidades inferiores (13 y 19 %) la diversidad taxonómica era mucho mayor, encontrándose representantes de al menos 7 phyla distintos (*Euryarchaeota*, *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* y *Betaproteobacteria*) (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a). Por otro lado, estos estudios revelaron que los géneros frecuentemente aislados en el laboratorio

a partir de estos ambientes no parecían constituir una proporción importante de las comunidades microbianas allí presentes, además de mostrar la presencia de nuevos y abundantes grupos de microorganismos no relacionados con los hasta entonces cultivados: un grupo perteneciente a la clase *Actinobacteria* con bajo contenido en G+C, una *Gammaproteobacteria* relacionada con los géneros *Alkalilimnicola* y *Nitrococcus*, posteriormente aislada en cultivo puro y descrita como *Spiribacter* (León et al., 2014), y dos grupos de euriarqueas, uno de alto contenido en G+C y otro de bajo contenido en G+C, correspondiente al phylum *Nanohaloarchaeota*, recientemente cultivado (Hamm et al., 2019).

Del resto de salinas solares estudiadas utilizando técnicas metagenómicas, cabe mencionar el estudio realizado en las salinas de Isla Cristina (Huelva), ya que se trata de uno de los ambientes acuáticos elegidos para el estudio en esta Tesis Doctoral. El estanque analizado en este ambiente en concreto se encontraba al 21 % de salinidad en el momento del muestreo, la comparación de la diversidad taxonómica de este sistema con respecto a las salinas “Bras del Port” de Santa Pola, mostró que era más similar al estanque con un 33 % de salinidad que al del 19 %, siendo la población dominante miembros del phylum *Euryarchaeota*, y concretamente el género *Halorubrum*, mientras que *Bacteroidetes* fue el único phylum bacteriano identificado, representado principalmente por los géneros *Salinibacter* y *Psychroflexus* (Fernández et al., 2014a, 2014b). Estos resultados parecen indicar que, en concordancia con estudios previos, además de la salinidad, otros factores adicionales pueden influir en las variaciones de las comunidades microbianas de estos hábitats (Pagaling et al., 2009; Grant et al., 2011; Boujelben et al., 2012; Podell et al., 2014).

El Mar Muerto es otro de los ejemplos mejor estudiados entre los ambientes hipersalinos acuáticos. La actividad microbiana en este hábitat es limitada, dada su elevada salinidad (alrededor del 35 % de sales totales), la presencia de un pH ácido (pH 6) y la elevada tasa de radiación a la que se encuentra expuesto (Jacob et al., 2017), estimándose un total de $5 \cdot 10^5$ células por ml, las cuales corresponden en su mayoría a miembros no cultivados de haloarqueas (Bodaker et al., 2010; Rhodes et al., 2012; Jacob et al., 2017). *Halorhabdus*, *Natronomonas* y *Haloplanus* son los géneros de arqueas conocidos más representados en este ambiente.

Otros ejemplos de ambientes hipersalinos acuáticos en los que se ha estudiado la biodiversidad son el Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.), el lago Tyrrell (Australia) o el lago Meyghan (Irán), entre otros.

El Gran Lago Salado (Utah, EE.UU.) ha sido objeto de numerosos estudios independientes de cultivo. En él, al igual que ocurre en otros ambientes hipersalinos, la diversidad de especies disminuye con la salinidad y se incrementa en áreas en la que la concentración de nutrientes es mayor (Larson & Belovsky, 2013). En el año 2014, Tazi y colaboradores determinaron que en la zona donde la salinidad alcanza el 30 %, el total de las secuencias de arqueas pertenecían al phylum *Euryarchaeota*, y mayoritariamente a los géneros *Natronomonas*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Haloquadratum*, *Haloferax*, *Halogeometricum* y *Haloarcula*, mientras que, en lo relativo a bacterias, se determinaron representantes de los géneros *Shewanella*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas* y *Marinobacter* en su mayoría.

Localizado en Australia, el lago Tyrrell es un sistema donde se dan grandes cambios de temperatura, pH, radiación solar, concentración de oxígeno y salinidad a lo largo del año (Macumber, 1992; Williams, 2001). Los estudios metagenómicos llevados a cabo en este hábitat han revelado que una gran parte de la microbiota presente en el mismo se encuentra constituida por miembros del phylum *Nanohaloarchaea*, así como por otros géneros como *Haloquadratum*, *Halorubrum*, *Halonotius*, *Halorhabdus*, *Halobaculum*, *Haloarcula* (*Euryarchaeota*) y *Salinibacter* (*Rhodothermaeota*) (Narasingarao et al., 2012; Emerson et al., 2013; Podell et al., 2013, 2014). La población microbiana en el lago Tyrrell también fluctúa estacionalmente, exhibiendo un mayor número de secuencias relacionadas con los grupos de bajo contenido en G+C (*Haloquadratum* y *Nanohaloarchaea*) en verano, mientras que en invierno son los grupos con alto contenido en G+C los que predominan, concretamente *Halorubrum* y *Haloarcula* (Emerson et al., 2013; Podell et al., 2014). Asimismo, los estudios de Podell y colaboradores (2014), indican que estas fluctuaciones podrían estar relacionadas con cambios en las concentraciones iónicas, ya que concentraciones elevadas de magnesio, potasio y sulfato se correlacionan positivamente con la presencia de *Haloquadratum*, mientras que lo hace negativamente con *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Halonotius*, *Halobaculum* y *Salinibacter*.

Por otra parte, el lago Meyghan en Irán, también ha sido objeto de estudios metagenómicos recientemente (Naghoni et al., 2017). Se trata de un lago hipersalino, de naturaleza talasosalina y con un carácter ligeramente alcalino (pH 7,7 – 8,8). En dicho estudio se analizó la comunidad microbiana presente en tres puntos de distinta salinidad (5, 18 y 30 % de sales totales). Los resultados del análisis metagenómico indicaron que en el punto de salinidad más baja predominan las diatomeas y el alga *Dunaliella*, así como las bacterias de los géneros *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* y *Vibrio*, mientras que en lo relativo a las arqueas, son los géneros *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronococcus*,

Halogeometricum y *Haloquadratum* los que abundan en este lugar. La diversidad microbiana encontrada en las otras dos bases de datos difiere bastante de ésta, siendo en estos casos, las haloarqueas en su mayoría las prevalentes, concretamente los géneros *Halorubrum*, *Haloferax*, *Halobacterium*, *Natronomonas* y *Haloarcula*, además de miembros del dominio *Bacteria* como *Halomonas* o *Salinibacter*.

Otros ambientes hipersalinos acuáticos objeto de estudios independientes de cultivo son algunos lagos de Mongolia (Ma *et al.*, 2004; Pagaling *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2011), los lagos Ursu (Máthé *et al.*, 2014) y Ocnei (Baricz *et al.*, 2014), en Rumanía, el lago Salton en California (EE.UU.) (Hawley *et al.*, 2014), el lago alcalino Lonar, en la India (Paul *et al.*, 2016), los lagos Magadi y Little Magadi en Kenia (Kambura *et al.*, 2016), lagos localizados en Rusia (Vavourakis *et al.*, 2016), el Hot Lake (Washington, EE.UU.) (Lindemann *et al.*, 2013; Kilmer *et al.*, 2014), así como varios lagos hipersalinos de la Antártida: Ekho Lake (Bowman *et al.*, 2000), Organic Lake (Bowman *et al.*, 2000; Yau *et al.*, 2011, 2013) y Deep Lake (Bowman *et al.*, 2000; DeMaere *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2014; Tschitschko *et al.*, 2016, 2018) en Vestfold Hills; Lake Bonney (Glatz *et al.*, 2006) y Lake Vida (Mosier *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2012) en McMurdo Dry Valleys; Lake Suribati Ike (Naganuma *et al.*, 2005; Matsuzaki *et al.*, 2006), en Droning Maud Coast; Don Juan Pond (Siegel *et al.*, 1979; Dickson *et al.*, 2013), Lake Vanda (Sumner *et al.*, 2016), en Wright Valley.

I.2.V.II. Ecología y biodiversidad en suelos salinos

Como ya se ha mencionado, el número de estudios realizados en suelos salinos es mucho menor a los correspondientes a ambientes acuáticos, y están limitados en su mayoría a trabajos publicados en los últimos años (de León-Lorenzana *et al.*, 2017; Xie *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Mora-Ruiz *et al.*, 2018; Narayan *et al.*, 2018; Oueriaghli *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2018; Vera-Gargallo & Ventosa, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Rath *et al.*, 2019; Vera-Gargallo *et al.*, 2019). Generalmente, en la mayoría de estos trabajos la comunidad de bacterias y arqueas se analiza de forma independiente.

Los suelos se consideran uno de los ambientes microbiológicamente más diversos, dada su alta heterogeneidad espacial y temporal (Walsh *et al.*, 2005; Carson *et al.*, 2010; Smucker *et al.*, 2010; Vos *et al.*, 2013), lo que contribuye a que en ellos exista una diversidad microbiana al menos un orden de magnitud superior al que podamos encontrar en los ambientes acuáticos (Curtis *et al.*, 2002; Torsvik *et al.*, 2002). Al igual que ocurre en los sistemas acuáticos, los primeros estudios sobre biodiversidad de suelos se basaron en técnicas clásicas de cultivo y más recientemente en técnicas independientes a éste.

Uno de los primeros trabajos sobre suelos hipersalinos se realizó en unas antiguas salinas abandonadas cercanas a Alicante en el cual se caracterizó la comunidad microbiana cultivable (Quesada *et al.*, 1982, 1983). La mayor parte de los aislados eran bacterias halófilas de crecimiento óptimo a salinidades comprendidas entre 5 y 15 %, mientras que sólo un 1 % de los aislados presentaban características de halófilos extremos.

Años más tarde, en la región de Rambla Salada en Murcia también se realizaron varios estudios sobre suelos y sedimentos salinos. Los resultados de Luque y colaboradores (Luque *et al.*, 2014) sobre la diversidad de bacterias cultivables de ambas muestras en esta zona revelan como grupos mayoritarios representantes de los phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (principalmente *Gammaproteobacteria*), siendo los géneros más frecuentemente aislados *Halomonas* (41,2 %), *Marinobacter* (12,9 %) y *Bacillus* (12,6 %). Además, mediante técnicas independientes de cultivo, en el año 2014, Oueriaghli y colaboradores, determinaron que el género *Halomonas* (*Gammaproteobacteria*) constituía un 4,4 y un 5,7 % de la comunidad microbiana tanto en suelos como en sedimentos de esta región. Otro estudio realizado en 2018 (Oueriaghli *et al.*, 2018) mediante DGGE en muestras a distintas salinidades, nivel de oxigenación y pH, mostró que la mayor parte de las secuencias correspondían con los phyla *Bacteroidetes* (39,73 %), *Proteobacteria* (28,43 %), *Firmicutes* (8,23 %) y *Cyanobacteria* (5,14 %). Por otra parte, en lo referente a las haloarqueas, eran los géneros *Haloferax* y *Natrinema*, los más frecuentemente aislados (Luque *et al.*, 2012), mientras que *Haloarcula*, *Natronomonas*, *Halomicrobium*, *Halobacterium* y *Halosimplex* eran los más detectados mediante métodos moleculares (Oueriaghli *et al.*, 2013).

A nivel de género, los estudios metagenómicos de Patel y colaboradores (2015) en un suelo de Little Rann of Kutch (India), identificaron *Marinobacter* (*Gammaproteobacteria*) y *Halobacterium* como los más abundantes de los dominios *Bacteria* y *Archaea*, con un 48 % y 4,6 % de las secuencias afiliadas respectivamente, seguido de otros como *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*), *Bacillus* (*Firmicutes*) o *Haloarcula* y *Halomicrobium* (*Euryarchaeota*). Asimismo, una gran proporción de secuencias afiliadas no pudieron ser clasificadas a nivel de género en este trabajo. En tanto que en el estudio de Pandit *et al.*, 2015 en suelos de Great Rann of Kutch, *Marinobacter* (*Gammaproteobacteria*), *Roseibacter* (*Alphaproteobacteria*), *Burkholderia* (*Betaproteobacteria*), *Geobacter* y *Desulfobacteria* (*Deltaproteobacteria*), *Salinibacter* y *Rhodothermus* (*Rhodothermaeota*) representaban los géneros mayoritarios de bacterias

y *Haloarcula*, *Halogeometricum*, *Natronomonas* y *Halobacterium*, las de arqueas. Las secuencias de bacterias detectadas en esta misma zona por Narayan y colaboradores (2018), pertenecían principalmente a *Bacillus* (10,8-37,9 %), *Pseudomonas* (1,7-4,5 %), *Salinibacter* (1,5-2 %) y *Halomonas* (1,1-4 %).

Otros estudios sobre diversidad bacteriana en suelos, como en Great Salt Plains (Oklahoma, EE.UU.) (Caton et al., 2004) mostraron, mediante métodos dependientes de cultivo, que la comunidad predominante en estos sistemas eran microorganismos Gram positivos de bajo G+C del género *Bacillus* y gammaproteobacterias del género *Halomonas*. En otro estudio realizado por Caton y colaboradores (2009) en la misma zona pero esta vez en arqueas, eran los géneros *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Haloterrigena* y *Natrinema* los más frecuentemente aislados.

Estudios metagenómicos realizados por Valenzuela-Encinas y colaboradores (2008), en suelos salinos alcalinos del antiguo lago Texcoco (México) (pH 11,75), mostraron que los géneros mayoritariamente representados eran *Natronococcus*, *Natronolimnobiis*, *Natronobacterium*, *Natrinema*, *Natronomonas*, *Halovivax* y *Halalkalicoccus*, además de otras secuencias relacionadas con grupos no caracterizados. Asimismo, en esa misma localización pero con pHs entre 8,5 y 10,5, Navarro-Noya y colaboradores (2015), determinaron que los géneros afiliados con más de un 0,5 % de las secuencias eran *Halobiforma*, *Halorhabdus*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natronococcus* y *Natronomonas*. Un estudio posterior en estos suelos irrigados con agua (de León-Lorenzana et al., 2017), reflejó que las comunidades de arqueas en este suelo apenas se veían afectadas por este proceso. La mayoría de las secuencias de este dominio encontradas, se afiliaban con el phyla *Euryarchaeota* (91,8 %), siendo concretamente *Halobacteriaceae* (79,2-96,9 %) y *Natronococcus* (12,1-21,8 %), la familia y géneros dominantes, respectivamente. En tanto que en el dominio *Bacteria*, los géneros dominantes pertenecían a los phyla *Alphaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Cyanobacteria*, seguidos de *Actinobacteria* y *Betaproteobacteria*. En este caso por el contrario, las comunidades bacterianas sí se vieron seriamente afectadas por la presencia de agua, produciéndose drásticas disminuciones en las familias *Halomonadaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*, así como, un incremento de las clases *Rhodothermales* (*Bacteroidetes*), *Nitriliruptorales* (*Actinobacteria*) y otros grupos no identificados.

Resultados similares a los de muchos de estos trabajos se obtuvieron en otros estudios sobre diversidad en otros puntos del planeta. *Bacillus*, *Halomonas* y *Shewanella* fueron los géneros más frecuentemente aislados por Irshad y colaboradores (2014) al analizar suelos costeros en varias regiones de Corea. Mientras que, *Halorubrum*, *Natrinema*, *Natronorubrum*, *Haloterrigena* y *Natronococcus* constituyen los géneros más abundantes, mediante técnicas independientes de cultivo, en un suelo transitoriamente salino en Salt Spring (Columbia Británica, Canadá) (Walsh et al., 2005). Secuencias afiliadas a los géneros *Haloferax* y *Natronomonas* fueron identificadas por Wang y colaboradores (2011) en suelos salinos contaminados de un yacimiento petrolífero en China, mientras que en diferentes muestras de suelos salinos de la meseta del Tíbet, *Halorubrum* y *Natronomonas* fueron los géneros principales de la clase *Halobacteria* encontrados por Liu y colaboradores (2016) mediante pirosecuenciación.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha analizado mediante técnicas metagenómicas la diversidad taxonómica existente en dos muestras de suelos salinos localizado en el Paraje Natural Marismas del Odiel, otro de los lugares estudiados también en la presente Tesis Doctoral. Los resultados de este trabajo revelaron que la diversidad procariota que podemos encontrar en suelos salinos es mucho mayor a la que existe en muestras de agua. Las secuencias encontradas en estas bases de datos metagenómicas han revelado que los microorganismos procariotas que habitan en dicho sistema pertenecen a los phyla *Euryarchaeota*, *Bacteroidetes*, *Balneolaeota* y *Rhodothermaeota*, siendo los géneros mayoritariamente representados *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natronomonas*, *Salinibacter*, *Fodinibius* y *Salinimicrobium*. En estos suelos además, se han identificado secuencias del phylum *Nanohaloarchaeota*, no identificadas anteriormente en ningún otro suelo salino. Asimismo, se han encontrado una gran cantidad de secuencias asignadas a microorganismos no cultivados, así como, otros grupos minoritarios que incluyen especies no halófilas o halotolerantes (Vera-Gargallo, 2018). En un estudio posterior en estos mismos suelos, se analizaron diversos parámetros ambientales relacionados con la distribución de la comunidad procariota y su diversidad. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la salinidad no constituye un factor muy relevante en la determinación de la estructura o diversidad procariota en el rango salino analizado. En cambio, otras propiedades geoquímicas del suelo, como la textura, la humedad, carbono, azufre y metales sí se relacionaban con cambios en la distribución espacial de la comunidad procariota en estos sistemas (Vera-Gargallo, 2018).

I.2.VI. Metabolismo de la clase *Halobacteria*

Aunque la mayoría de las haloarqueas comparten características comunes, como la presencia de un proteoma ácido, cadena respiratoria o rodopsinas, la diversidad metabólica que podemos encontrar entre los organismos halófilos es muy variada, existiendo diferentes procesos mediante los cuales los microorganismos halófilos obtienen carbono y energía. Las arqueas halófilas no sólo difieren en lo que a rutas metabólicas se refiere, también en sus requerimientos nutricionales (Falb et al., 2008). La gran mayoría de las haloarqueas descritas son heterótrofas y aerobias, capaces de crecer en un amplio rango de sustratos, entre los que se incluyen aminoácidos y carbohidratos, aunque también encontramos algunas con un metabolismo más limitado (Anderson et al., 2011; Andrei et al., 2012). Así, *Haloferax mediterranei*, *Halorubrum saccharovorum*, *Haloarcula marismortui* y *Halococcus saccharolyticus* pueden catabolizar hexosas (glucosa, fructosa), pentosas (arabinosa, xilulosa), sacarosa y lactosa, mientras que *Halobacterium salinarum* o *Natronomonas pharaonis* en cambio, son incapaces de crecer a partir de azúcares (Rawal et al., 1988; Altekar & Rangaswamy, 1992; Johnsen et al., 2001; Johnsen & Schönheit, 2004). *Haloferax volcanii* por su parte, requiere ácidos orgánicos y glicerol para su crecimiento (Kauri et al., 1990).

Se han descrito haloarqueas capaces de degradar polímeros, gracias a la producción de enzimas como amilasas, DNAsas, lipasas y proteasas (Oren, 2006a). Algunos representantes del grupo utilizan un número de sustratos poco comunes, como hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Bertrand et al., 1990; Zvyagintseva et al., 1995). Se ha demostrado que una cepa de *Haloferax* aislada a partir de suelo contaminado con petróleo, crecía sobre diferentes compuestos aromáticos, incluyendo benzoato, cinamato y 3-fenilpropionato, como única fuente de carbono y energía (Emerson et al., 1994). Asimismo, Zhao y colaboradores (Zhao et al., 2017) aislaron una cepa relacionada con el género *Halorientalis* capaz de crecer y utilizar hexodecanos como fuente de carbono. Más recientemente, también han sido descritas varias haloarqueas alcalófilas capaces de utilizar sustratos como la celulosa o la quitina (Sorokin et al., 2015, 2019a, 2019b).

I.2.VI.I. Metabolismo del carbono

En lo que respecta al metabolismo del carbono, los polisacáridos son la principal fuente empleada. Su utilización implica la captación por medio de transportadores específicos de membrana y su hidrólisis intracelular para generar hexosas (glucosa, galactosa, manosa o fructosa) y pentosas (xilosa o arabinosa), las cuales serán oxidadas por una serie de rutas metabólicas centrales.

Podemos encontrar una gran variedad de rutas para la degradación de la glucosa a piruvato, siendo la ruta de Embden-Meyerhof (EM) o glicolisis la más extendida en los tres dominios de la vida (Figura 5). Esta ruta sin embargo, no es funcional en haloarqueas ya que las actividades hexoquinasa y fosfofructoquinasa son bajas y se inhiben a elevadas concentraciones salinas (Rawal *et al.*, 1988). Aunque estudios recientes basados en métodos moleculares han detectado actividad hexoquinasa o fosfofructoquinasa en haloarqueas, los genes codificantes de estas enzimas no han podido ser identificados (Williams *et al.*, 2019). Además, estos autores indican que la presencia de una u otra actividad es excluyente de la otra, lo que reafirma la carencia de funcionalidad de esta vía (Williams *et al.*, 2019). Este grupo por tanto, emplea otras formas alternativas, como la ruta Entner-Doudoroff (ED) modificada o la ruta de las pentosas fosfato (PP), entre otras (Melendez-Hevia *et al.*, 1997).

En la ruta ED modificada que presentan las haloarqueas (Figura 5), el paso de la fosforilación está postpuesto. La glucosa es oxidada a 2-ceto-3-desoxigluconato (KDG) y después fosforilada a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG), el cual se escinde en piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (Tomlinson *et al.*, 1974). Finalmente, converge en la vía denominada de tres átomos de carbono de la ruta EM para llegar a producir piruvato (Danson, 1993; Fothergill-Gilmore & Michels, 1993). Esta última parte de la ruta parece ser ubicua en arqueas, lo que sugiere un origen ancestral (Ronimus & Morgan, 2003), a diferencia de lo que ocurre en la primera parte, donde la existencia de diferentes variantes de las enzimas glicolíticas refleja una evolución independiente. Las enzimas conservadas (3-fosfoglicerato a piruvato) probablemente son el resultado de la transferencia horizontal de genes, mientras que las enzimas únicas lo son de la evolución independiente (de glucosa a 3-fosfoglicerato) (Verhees *et al.*, 2003).

La gluconeogénesis, por su parte, es la ruta biosintética en la cual el piruvato es convertido de nuevo en fructosa 6-fosfato o glucosa 6-fosfato, en algunos casos incluso, llegando hasta glucosa (Figura 5). Parece estar presente en la mayoría de las haloarqueas, siendo *Halorhabdus utahensis* una de las pocas excepciones (Anderson *et al.*, 2011). La vía gluconeogénica comparte muchas enzimas con la de EM, por lo que se puede considerar la parte reversible de esta ruta. Solo tres enzimas son específicas de la misma: piruvato carboxilasa, fructosa-1,6-bifosfatasa y glucosa-6-fosfatasa. Además, muchos de los

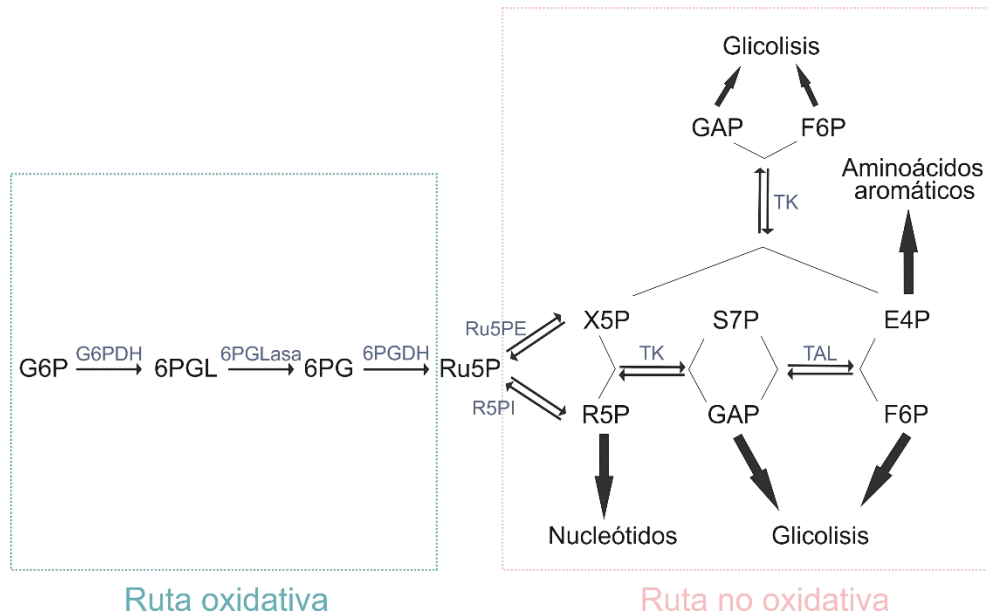


Figura 6. Representación de la ruta de las pentosas fosfato. Los nombres en azul corresponden a las enzimas. **Abreviaciones:** G6P, glucosa-6-fosfato; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 6PGL, 6-fosfoglucono- δ -lactona; 6PGLasa, 6-fosfoglucono- δ -lactonasa; 6PG, 6-fosfogluconato; 6PGDH, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; Ru5PE, ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa; R5PI, ribosa-5-fosfato isomerasa; R5P, ribosa-5-fosfato; X5P, xilulosa-5-fosfato; TK, transcetolasa; S7P, sedoheptulosa-7-fosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; TAL, transaldolasa; E4P, eritrosa-4-fosfato y F6P, fructosa-6-fosfato.

Una vez generado el piruvato tras el proceso glicolítico, este es convertido en acetil-CoA por la enzima piruvato-ferredoxin oxidorreductasa (*porAB*) para posteriormente entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs (Figura 7A). Aunque este ciclo dentro del dominio *Archaea* es muy variable y a menudo aparece incompleto, las haloarqueas en cambio sí codifican todos los genes de las enzimas participantes en el mismo (Huynen *et al.*, 1999). No obstante, aunque las haloarqueas codifican el complejo 2-oxoácido dehidrogenasa, es la enzima 2-oxoacid-ferredoxina oxidorreductasa (*porAB* y *korAB*), como se ha mencionado, la que actúa sobre el piruvato y el 2-oxoglutarato, respectivamente (Kerscher & Oesterhelt, 1981a, 1981b), por lo que Falb y colaboradores (2008) sugieren que este complejo juegue un papel dentro de la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada. El ciclo del glioxilato constituye una variante metabólica de esta ruta, concretamente de las etapas descarboxilantes (Figura 7B). Este ciclo ha sido descrito para *Haloferax volcanii* en presencia de acetato, mediante las enzimas isocitrato liasa y un tipo de malato sintetasa (Serrano & Bonete, 2001), así como se han detectado homólogos de estas enzimas en *Natronomonas pharaonis* y *Haloquadratum walsbyi* (Falb *et al.*, 2008).

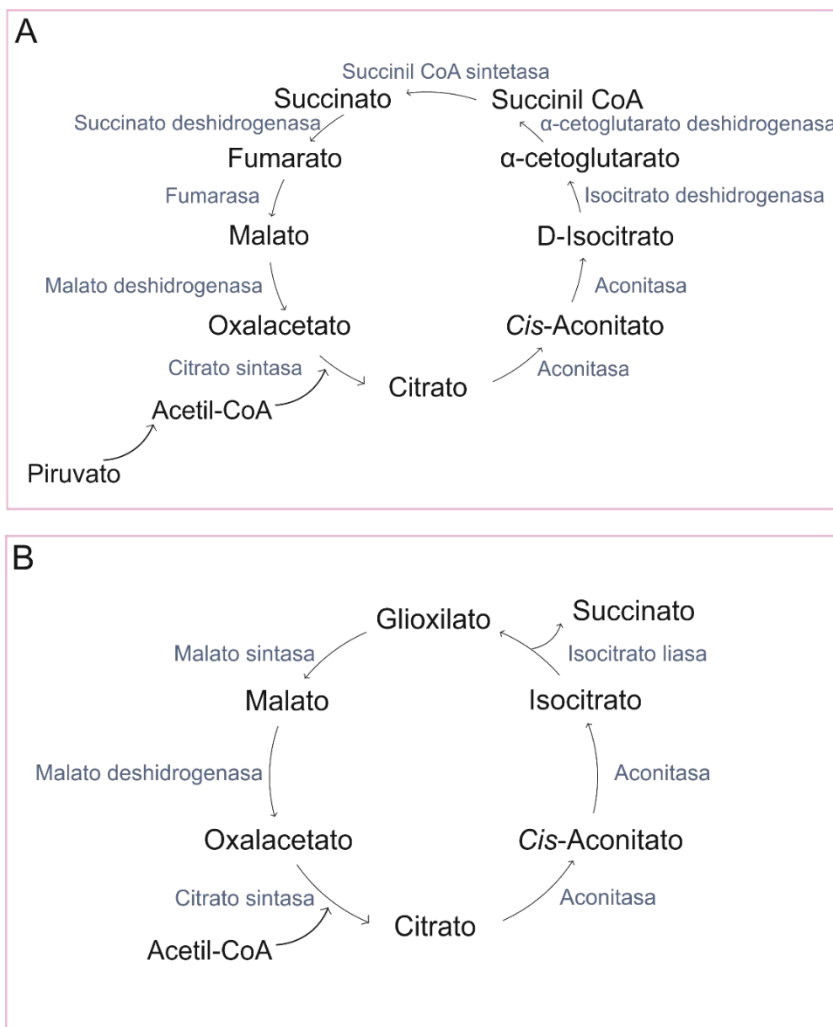


Figura 7. Representación de: **A)** ciclo de los ácidos tricarboxílicos; **B)** ciclo del glioxilato.

Por otro lado, el uso de los carbohidratos está asociado habitualmente a la producción de ácidos, ya que la oxidación de cada sustrato es incompleta (Hochstein et al., 1978; Hochstein, 1988). Cuando *Halorubrum saccharovorum* crece en un medio con glucosa, se ha demostrado que excreta acetato y piruvato (Tomlinson & Hochstein, 1972; Tomlinson et al., 1978). Con otros azúcares se pueden formar ácidos aldónicos: *Halorubrum saccharovorum* produce ácido galactónico en presencia de galactosa (Hochstein et al., 1976); y a partir de lactosa se forma ácido lactobiónico (Tomlinson et al., 1978); asimismo la arabinosa, la ribosa y la xilosa se oxidan a sus correspondientes ácidos aldónicos (Hochstein et al., 1978; Hochstein, 1988). En cultivos de diversas especies de *Haloferax* y *Haloarcula* que crecen en presencia de glicerol se ha identificado acetato, piruvato y D-lactato (Oren & Gurevich, 1994).

1.2.VI.II. Metabolismo del nitrógeno

En relación con el nitrógeno, existe una gran diversidad metabólica. El nitrógeno es uno de los elementos esenciales de las células, siendo concretamente el ion amonio, la fuente de nitrógeno inorgánico más comúnmente asimilado. Este compuesto puede ser incorporado directamente a la célula a través del transportador Amt, o bien obtenerse de forma indirecta a través del ciclo del nitrógeno. Dentro del ciclo del nitrógeno pueden tener lugar diferentes procesos como la fijación de dinitrógeno (N_2) o la reducción de nitratos por las vías asimilatoria o desasimilatoria (Bonete *et al.*, 2008). Existen, asimismo, otros transportadores implicados en la captación de compuestos nitrogenados, ya sea en forma de nitratos, aminoácidos o derivados nitrogenados como la taurina, urea, putrescina o espermidina (Bonete *et al.*, 2008; Michael, 2018).

Algunas haloarqueas son fijadoras de dinitrógeno, el cual pasa a ion amonio mediante la enzima nitrogenasa. Este amonio así generado puede ser utilizado de diferentes maneras, bien para sintetizar biomoléculas que contengan nitrógeno, o bien, para su oxidación a nitrato y posteriormente a nitrito (proceso denominado nitrificación) (Figura 8A) (Bonete *et al.*, 2008).

En la vía asimilatoria, el nitrato es reducido secuencialmente a nitrito y éste, a su vez, a amonio, mediado por las enzimas nitrato (Nas) y nitrito (Nir) reductasas, respectivamente. Este amonio será utilizado para la síntesis de compuestos nitrogenados, mediante la formación de glutamato (Figuras 8A y 8B). Este proceso puede darse mediante dos vías. La primera de ellas se da preferentemente a altas concentraciones de amonio y tiene lugar mediante una única reacción reversible en la cual los compuestos 2-oxoglutarato, amonio y $NADPH^+$ dan lugar a glutamato y $NADP^+$, mediada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). En la segunda, en cambio, tienen lugar dos reacciones enzimáticas irreversibles que ocurren de forma secuencial, catalizadas por las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), respectivamente. En primer lugar, los compuestos glutamato, amonio y ATP dan lugar a glutamina, ADP y fosfato inorgánico. Seguidamente, la glutamina así generada junto con 2-oxoglutarato generan dos moléculas de glutamato con la subsecuente formación de energía. Esta segunda vía es particularmente importante ya que favorece la asimilación de amonio cuando sus concentraciones citosólicas son bajas (Bonete *et al.*, 2008). En ambos casos, una vez sintetizado el glutamato, el grupo α -amino puede ser transferido a otros esqueletos de carbono mediante reacciones de transaminación, dando lugar así a los diferentes aminoácidos (Reitzer, 2005).

encuentran interrelacionados unos con otros. Las haloarqueas pueden también obtener otros compuestos nitrogenados a través de procesos como la degradación de aminoácidos mediante enzimas específicas o en el catabolismo de la urea (Falb et al., 2008).

I.2.VI.III. Metabolismo anaerobio

Uno de los factores que puede limitar el desarrollo de las haloarqueas en los ambientes hipersalinos es la disponibilidad de oxígeno, debido fundamentalmente a la baja solubilidad del mismo en altas concentraciones de sales. Por este motivo, algunas haloarqueas pueden compensar esta limitación produciendo vesículas de gas que les permite flotar hacia la interfase aire-agua (Oren, 2006). Muchas arqueas halófilas, además, son capaces de crecer en anaerobiosis, utilizando aceptores de electrones diferentes al oxígeno, o mediante la fermentación de compuestos orgánicos. Otras incluso, pueden llevar a cabo procesos estrictamente anaerobios como la metanogénesis, la homoacetogénesis o la desasimilación de azufre (Oren, 2002, 2011a; Sorokin et al., 2016a, 2016b).

Entre los aceptores finales de electrones alternativos al oxígeno utilizados por las haloarqueas se encuentran el nitrato, el dimetilsulfóxido, la trimetilamina N-oxidada o el fumarato (Oren, 2006, 2008). La capacidad de reducción del nitrato se encuentra ampliamente distribuida entre los miembros de la clase *Halobacteria*. *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis* y *Haloferax mediterranei* son algunos ejemplos de haloarqueas capaces de crecer anaeróbicamente utilizando el nitrato como aceptor final de electrones (Mancinelli & Hochstein, 1986). Hochstein y colaboradores (1991) describieron la presencia de enzimas nitrato reductasas en *Haloferax denitrificans* y *Haloferax mediterranei*, y, años más tarde, diversos estudios también revelaron la presencia del complejo NarGH (nitrato reductasa respiratoria) en *Haloarcula marismortui* y *Haloferax mediterranei*, entre otras, permitiéndoles reducir el nitrato en condiciones anaerobias (Yoshimatsu et al., 2002; Lledó et al., 2004; Martínez-Espinosa et al., 2006). El nitrato generalmente es reducido a N₂, aunque también se ha visto en otras especies la formación de N₂O (Hochstein & Tomlinson, 1985; Mancinelli & Hochstein, 1986; Tomlinson et al., 1986). Considerando las bajas concentraciones de nitrato que se encuentran generalmente en los sistemas hipersalinos, y la aparente ausencia del proceso regenerativo del mismo (nitrificación) a elevadas concentraciones salinas, cabe esperar que este proceso solo ocurra de forma limitada en la naturaleza (Oren, 1994).

Otros aceptores de electrones alternativos para la respiración en muchas especies son el dimetilsulfóxido (DMSO), la trimetilamina N-oxidada (TMAO) y el fumarato. Mientras que *Halobacterium salinarum*, *Haloferax mediterranei*, *Haloarcula marismortui* y *Haloarcula vallismortis* crecen en anaerobiosis en presencia de DMSO o TMAO; *Haloferax volcanii*, por su parte, crece en anaerobiosis en presencia de DMSO, pero no de TMAO (Oren & Trüper, 1990). Por otro lado, aunque la importancia ecológica de la reducción de DMSO no está bien definida, TMAO, sin embargo, parece estar disponible como aceptor de electrones en pescados en salazón (Oren & Trüper, 1990).

En los últimos años, también se ha descrito el uso de nuevos aceptores de electrones en grupos de arqueas halófilas y haloalcalófilas, anaerobias estrictas o facultativas, como los géneros *Halanaeroarchaeum*, *Halalkaliarchaeum* y alguna especie de *Natronolimnobius* (Sorokin et al., 2016a, 2016b, 2019b). Estos grupos son capaces de crecer por oxidación del acetato, formiato o butirato utilizando el azufre como aceptor de electrones (Sorokin et al., 2016a, 2016b, 2018b, 2019c). Destaca especialmente el uso del acetato como donador de electrones, ya que este no había sido identificado previamente en ningún otro grupo del dominio Archaea (Sorokin et al., 2016b).

Asimismo, se han descrito que las haloarqueas puedan participar también en procesos fermentativos. *Halobacterium salinarum* es capaz de fermentar L-arginina hasta citrulina, permitiéndole el crecimiento en anaerobiosis, así como otras haloarqueas fermentan la arginina dando lugar a ornitina, amonio o dióxido de carbono (Hartmann et al., 1980; Oesterhelt, 1982; Bickel-Sandkötter et al., 1996; Ruepp & Soppa, 1996; Oren, 2006).

I.2.VI.IV. Otros metabolismos

En la mayoría de los ambientes hipersalinos, el glicerol es una fuente de carbono muy abundante, el cual es producido en grandes cantidades por el alga *Dunaliella* (Borowitzka et al., 1977; Phadwal & Singh, 2003). Se ha descrito la capacidad de varios grupos de haloarqueas para catabolizar el glicerol mediante su fosforilación a glicerol 3-fosfato con la subsecuente formación de dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La arquea haloalcalófila *Natronomonas pharaonis* carece de esta ruta de degradación, lo que podría estar relacionado con los ambientes alcalinos en los que habita donde *Dunaliella* no es productor primario. Cabe mencionar que el glicerol 3-fosfato derivado del metabolismo del glicerol no es el mismo utilizado en la síntesis del esqueleto glicerofosfato de los lípidos de haloarqueas, por lo que se trata de rutas metabólicas independientes entre sí (Nishihara et al., 1999).

La luz es también una fuente de recursos en muchos ambientes hipersalinos, por lo que una gran variedad de microorganismos halófilos son capaces de obtener energía a partir de ella. Uno de estos mecanismos consiste en la utilización de pigmentos retinales, denominados rodopsinas, las cuales transforman la luz en energía (Oren, 2011a; Pinhassi et al., 2016). Las rodopsinas microbianas fueron por primera vez descritas en la haloarquea *Halobacterium salinarum* (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971, 1973), aunque posteriormente se han encontrado distribuidas en los tres dominios del árbol de la vida e incluso en virus (Grote, 2011; Ernst et al., 2014; Pushkarev & Béjà, 2016). Sus funciones son muy diversas, pueden actuar como bombas de protones, de iones cloruro, canales de iones (*channelrhodopsin*) o sensores de luz (de tipo I y II, los cuales actúan como sensores fototáxicos positivos y negativos, respectivamente) (Figura 9) (Pinhassi et al., 2016).

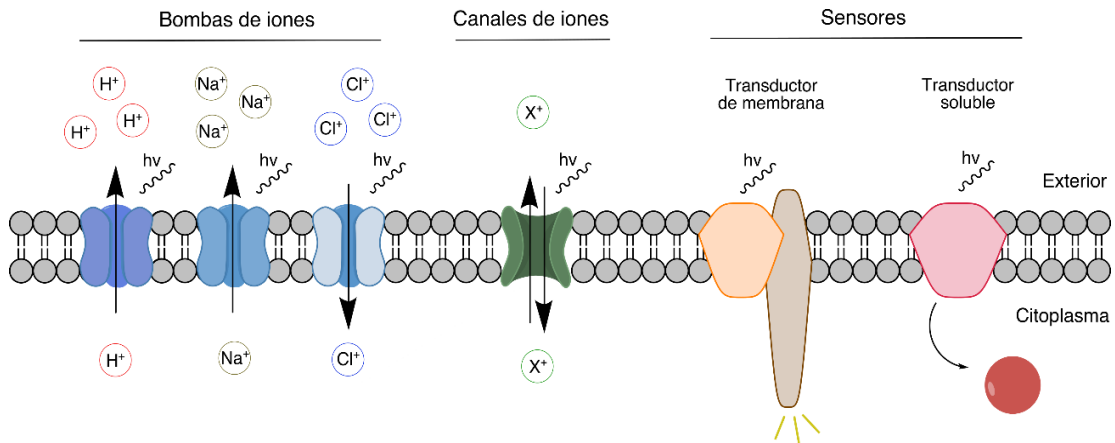


Figura 9. Representación de los diferentes tipos de rodopsinas microbianas (Vera-Gargallo, 2018).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el gradiente de protones generado por las rodopsinas ayuda al mantenimiento del contenido energético celular en algunos casos incluso aumentando la supervivencia de las células en condiciones de estrés nutricional, o estimulando el crecimiento en presencia de luz (Oren, 2011a; Pinhassi et al., 2016). Por ejemplo, *Halobacterium salinarum* es capaz de crecer en anaerobiosis en presencia de luz gracias a sus bacteriorrodopsinas (Hartmann et al., 1980; Oesterhelt & Krippahl, 1983).

1.3. La importancia del cultivo puro

Durante las últimas décadas el enorme avance en las técnicas de secuenciación masiva ha revolucionado el concepto de diversidad y ecología microbiana, revelando que existe una biodiversidad mucho mayor a la esperada inicialmente. Además, estudios independientes de cultivo basados en técnicas moleculares han revelado que la mayor parte de esta diversidad presente en la naturaleza no ha podido ser obtenida en cultivo puro (Zengler, 2009), un concepto universalmente conocido como “*great plate count anomaly*” (Staley & Konopka, 1985; Nichols, 2007). Sin embargo, el aislamiento de los microorganismos en cultivo puro sigue siendo imprescindible, y resulta esencial, entre otros, para el desarrollo de la ciencia y la tecnología, ya que el posible potencial metabólico de una determinada especie microbiana o la anotación y caracterización funcional de nuevos genes únicamente puede ser verificado con los correspondientes estudios en microorganismos cultivados (Gutleben et al., 2018). Asimismo, solo mediante su cultivo se puede realmente caracterizar un microorganismo y obtener la información más fidedigna sobre su filogenia, metabolismo y relevancia ecológica (Gutleben et al., 2018). Por este motivo, cultivar sigue siendo indispensable y una mejora de las técnicas de cultivo resulta imprescindible (Vartoukian et al., 2010).

Para conseguir el aislamiento de estos escurridizos grupos, se requieren numerosos esfuerzos entre los que se incluyen la formulación de nuevos medios de cultivo, la optimización y enriquecimiento de los mismos, la mimetización de las condiciones naturales simulando el entorno en cuestión, la utilización de medios oligotrofos o el desarrollo de técnicas de cultivo *in situ* para mejorar las interacciones microbianas (Prakash et al., 2013). En este sentido, se ha conseguido aislar algunos de los microorganismos más abundantes y esquivos en los ambientes naturales, como por ejemplo, *Pelagibacter ubique*, la bacteria heterotrófica más abundante en los ambientes marinos, que no es capaz de crecer bajo condiciones estándares y para su aislamiento fueron necesarias numerosas mejoras en las técnicas de cultivo (Rappé et al., 2002). De forma parecida, en los ambientes hipersalinos, aunque numerosos estudios de aislamiento han permitido describir más de cien grupos diferentes de arqueas y bacterias halófilas, algunos de los representantes más abundantes en éstos han resultado muy difíciles de aislar y otros muchos aún no han conseguido obtenerse en cultivo puro. *Haloquadratum walsbyi* (Burns et al., 2007), *Spiribacter* (León et al., 2014) o *Nanohaloarchaea* (Hamm et al., 2019) constituyen algunos ejemplos de microorganismos abundantes en estos ambientes, de crecimiento muy lento y fastidioso, lo que los hace

difíciles de aislar y caracterizar (Ghai et al., 2011; Narasingarao et al., 2012; Podell et al., 2013).

En algunos de estos casos, la metagenómica ha desempeñado un papel muy importante. Aporta un enorme volumen de información, permitiendo obtener datos sobre el metabolismo de los microorganismos que habitan en un determinado ambiente, y proporcionando así información para el desarrollo de medios de cultivo y condiciones de crecimiento específicas (Bomar et al., 2011; Prakash et al., 2013). Por tanto, algunos autores afirman que tanto el cultivo como las técnicas ómicas, constituyen dos caras de una misma moneda y que lo más recomendable sería trabajar conjuntamente empleando ambas estrategias (Leadbetter, 2003; Overmann, 2010; Gutleben et al., 2018).

I.4. Taxonomía clásica vs. taxonomía moderna

La taxonomía es la ciencia que permite la clasificación, identificación y nomenclatura de los organismos vivos. La clasificación es la organización de los microorganismos según características morfológicas, fisiológicas y genéticas similares en grupos específicos o taxones. La identificación microbiana, por su parte, es el proceso mediante el cual se delinean las características importantes de un microorganismo. Por último, la nomenclatura es la denominación de los microorganismos según reglas y normas establecidas (Brock et al., 2003).

La especie es el grupo taxonómico más elemental y puede definirse como un conjunto de cepas que comparten características fisiológicas y genéticas, y que, como grupo, difieren de manera notable de otras especies microbianas. El género, a su vez, es el siguiente taxón más alto, y comprende especies diferentes que comparten varias características genéticas y fenotípicas, pero que difieren lo suficiente para seguir manteniendo su estatus como especies individuales (Brock et al., 2003).

Las primeras descripciones de especies microbianas se realizaron en base a rasgos fenotípicos (morfología, fisiología y condiciones de cultivo). Años más tarde, con el desarrollo de las técnicas moleculares en las décadas de 1960 y 1970, se produjo un importante avance en taxonomía gracias al desarrollo de los métodos de hibridación ADN-ADN (DDH) y a la identificación del gen ARNr 16S como marcador filogenético molecular (Pardue & Gall, 1969; Woese et al., 1975; Woese & Fox, 1977). Cepas que comparten porcentajes de hibridación ADN-ADN superiores al 70 % o del 97 % en el caso del ARNr 16S fueron consideradas como una misma especie (Stackebrandt & Goebel, 1994; Stackebrandt et al., 2002).

Actualmente, la caracterización taxonómica de arqueas y bacterias halófilas para su descripción como nuevos taxones se basa en un estudio multimetodológico en el que se analizan sus características filogenéticas, quimiotaxonómicas, genotípicas y fenotípicas. En concreto, en el caso de las haloarqueas, que son las que nos ocupan en esta Tesis Doctoral, se siguen los requerimientos mínimos recomendados por el Subcomité de Taxonomía de Haloarqueas, dependiente del *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP), y publicado en 1997 (Oren *et al.*, 1997), así como algunas recomendaciones posteriores (Oren & Ventosa, 2016, 2019; Arahál *et al.*, 2017).

Más recientemente, los avances en taxonomía microbiana han estado orientados al desarrollo de estudios genómicos que permitan crear un concepto de especie procariota más universal y transparente. Hoy en día, la descripción de nuevos taxones de arqueas y bacterias requiere, como mínimo, la secuenciación del genoma de la cepa tipo del taxón a describir, y su comparación genómica con las cepas tipo de las especies más cercanas filogenéticamente, además de la especie tipo del género más estrechamente relacionado (Chun *et al.*, 2018).

En lo referente a la caracterización filogenética, tradicionalmente la secuenciación del gen ARNr 16S ha sido la técnica más ampliamente utilizada para la sistemática de procariotas, dada su rapidez, bajo coste y alta reproducibilidad (Ludwig & Schleifer, 1999; Ludwig & Klenk, 2001). Aún hoy, este gen continúa siendo el marcador filogenético estándar. En el caso de las haloarqueas, la posible presencia de dos o más copias del operón ribosómico con una divergencia superior a un 5-6,7 % de los nucleótidos (suficiente como para considerar al mismo microorganismo como dos especies distintas), hace que la divergencia intragenómica del gen ARNr 16S deba determinarse mediante clonación y posterior secuenciación (Boucher *et al.*, 2004; Papke *et al.*, 2011). Algunos ejemplos son los géneros *Haloarcula*, *Halosimplex*, *Natrinema*, *Haladaptatus*, *Haloferax*, *Halomicrobium*, *Haloquadratum*, *Halomicroarcula* o *Natronoarchaeum* (Boucher *et al.*, 2004; Papke *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013). No obstante, se han descrito algunas limitaciones del mismo ya que, debido a su baja tasa de evolución, en ciertos casos no permite discriminar correctamente entre especies distintas muy próximas filogenéticamente, como por ejemplo en el caso de las especies del género *Halorubrum* (Pesenti *et al.*, 2008; Mancinelli *et al.*, 2009).

Es por eso que en la caracterización filogenética de las haloarqueas se han empleado otras aproximaciones, como el uso de determinados genes esenciales denominados *housekeeping* (*radA* o *rpoB'*), que permiten determinar la semejanza genómica entre microorganismos y resolver con mayor sensibilidad la estructura genealógica del taxón

(Sandler et al., 1999; Walsh et al., 2004; Enache et al., 2007; Minegishi et al., 2010). Sin embargo, dado que las haloarqueas frecuentemente también presentan recombinaciones y transferencia horizontal de genes, no se recomienda confiar en un único gen (Nelson-Sathi et al., 2012; Williams et al., 2012; DeMaere et al., 2013). Durante los últimos años se ha estado empleando la técnica denominada MLSA (*MultiLocus Sequence Analysis*), que permite el estudio de la secuencia concatenada de varios de estos genes esenciales (*housekeeping*). El inconveniente de esta técnica es que hasta el momento no se ha descrito una combinación de genes que pueda ser empleada de forma universal, y, por tanto, habría que seleccionar unos genes concretos para cada grupo taxonómico (Pascual et al., 2010).

Por ello, con el avance en la taxonomía microbiana y la secuenciación de los genomas de los nuevos taxones a describir, actualmente se recomienda realizar un análisis filogenómico en base al total de genes ortólogos compartidos (COGs, *Core Orthologous Genes*) entre las cepas objeto de estudio y las especies filogenéticamente cercanas. Éste es el método más válidamente aceptado y el que aporta la máxima fiabilidad, especialmente a nivel de género y niveles superiores (Chun et al., 2018).

En lo que respecta a la caracterización genotípica, el método estándar para la delineación de especie procariota ha sido durante muchos años la técnica de hibridación ADN-ADN experimental (DDH). De forma general, estos experimentos se han llevado a cabo incluyendo pocos microorganismos, ya que resultan muy laboriosos y costosos económicamente. Además, la imposibilidad de crear una base de datos debido a que los resultados son por parejas de microorganismos y a que la reproducibilidad de los resultados depende de la metodología empleada, hace que la fiabilidad de esta técnica sea en muchos casos cuestionable (Hartford & Sneath, 1988; Goodfellow et al., 1997).

Gracias al espectacular avance metodológico en los últimos años y a la secuenciación de los genomas de las cepas tipo, la técnica de hibridación ADN-ADN experimental ha sido reemplazada por el método de hibridación ADN-ADN *in silico*, el cual permite la comparación de parejas de genomas mediante el uso de una herramienta bioinformática (Klappenbach et al., 2007; Auch et al., 2010a, 2010b; Meier-Kolthoff et al., 2013). Este programa también permite calcular las diferencias en el contenido en G+C del ADN (Meier-Kolthoff et al., 2013), otra de las características genotípicas por excelencia.

Otras alternativas ampliamente aceptadas hoy en día para la definición de nuevos taxones son los índices de identidad nucleotídica media (ANI) e identidad aminoacídica media (AAI), los cuales representan el promedio de identidad de las secuencias de nucleótidos o

aminoácidos, respectivamente, que muestran todos los genes ortólogos compartidos (Konstantinidis & Tiedje, 2005a, 2005b; Richter & Rosselló-Móra, 2009; Lee *et al.*, 2016; Yoon *et al.*, 2017). Debido a las diferencias evolutivas de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas, los resultados obtenidos mediante ambos índices presentan diferentes niveles de resolución, siendo el ANI el más recomendable para microorganismos filogenéticamente relacionados y el AAI para grupos filogenéticamente más distantes (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014).

Por otro lado, en el caso de las haloarqueas, resulta de especial importancia el estudio de la composición de los lípidos polares de sus membranas, el cual constituye un excelente marcador taxonómico, ya que el tipo de glicolípido presente es constante en la mayoría de las especies, resultando así una característica muy importante para la diferenciación fundamentalmente a nivel de género (Oren *et al.*, 2009; Ventosa *et al.*, 2012).

Todas las haloarqueas poseen características comunes, como la presencia en sus membranas de lípidos polares con enlaces de tipo éter, fácilmente detectables por cromatografía en capa fina (HPTLC) (Ventosa, 2006; Ventosa *et al.*, 2012). El lípido central diéter que forma la mayoría de las estructuras de los lípidos polares presentes en estos microorganismos es el 2,3-di-O-fentanil-sn-glicerol ($C_{20}C_{20}$). Sin embargo, algunas especies contienen, también, 2-O-sesterfanil-3-O-fentanil-sn-glicerol asimétrico ($C_{20}C_{25}$) en cantidades variables (Oren, 2006b). Además, en las haloarqueas se han identificado una gran variedad de glicolípidos como di-, tri-, y tetraglicosil diéter, algunos de ellos con grupos sulfato sobre los azúcares (Oren, 2006b). Otras características diferenciales sobre la composición de lípidos polares en las haloarqueas son la presencia de fosfatidilglicerol sulfato metil éster (PGP-Me) y fosfatidilglicerol (PG) como fosfolípidos principales de todas las haloarqueas (Torreblanca *et al.*, 1986; Kate, 1993), la presencia de fosfatidilglicerol sulfato (PGS) en algunas especies y su ausencia en otras (Tindall *et al.*, 1984; Torreblanca *et al.*, 1986; Kate, 1993) o la ausencia de glicolípidos en arqueas haloalcalófilas (Tindall *et al.*, 1984; Kate, 1993).

Finalmente, la caracterización fenotípica incluye, entre otros, el estudio de las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y nutricionales de los microorganismos a describir. Cabe destacar que muchas de las pruebas utilizadas para esta caracterización pueden verse afectadas por las condiciones de cultivo y la metodología empleada. Por este motivo, es necesario realizar un estudio experimental comparativo con las especies objeto de estudio y las especies filogenéticamente más

relacionadas, utilizando en todos los casos las mismas condiciones experimentales (Schleifer, 2009; Tindall et al., 2010).

Aunque la caracterización fenotípica esté cayendo en desuso y tenga muchos detractores (los cuales recomiendan la obtención de estos datos a partir del genoma), no podemos olvidar que ésta sigue siendo importante, ya que algunos de los genes, aunque presentes, puede que no se expresen en determinadas condiciones o no ser funcionales, por tanto estas características sólo son demostrables de manera experimental. Asimismo, el estudio del genoma permite contrastar la veracidad de los resultados obtenidos experimentalmente por lo que lo más recomendable sería llevar a cabo una exhaustiva comparación del genoma vs el fenoma. Por otro lado, la caracterización morfológica y fisiológica de los microorganismos a describir debe ser requisito indispensable, ya que permite conocer el aspecto del nuevo taxón en cuestión y los requerimientos para su crecimiento en condiciones óptimas.

1.5. Grupos estudiados para la descripción de nuevos taxones

En esta Tesis Doctoral se han caracterizado y descrito varios nuevos grupos de arqueas halófilas, pertenecientes a dos órdenes y familias diferentes: *Halobacteriales* y *Haloferacales*, y *Haloarculaceae* y *Halorubraceae*, respectivamente.

1.5.1. Orden *Halobacteriales*

Actualmente el orden *Halobacteriales* se encuentra constituido por tres familias *Halobacteriaceae*, *Halococcaceae* y *Haloarculaceae* (Gupta et al., 2016). Los miembros de este orden han sido aislados a partir de diferentes ambientes hipersalinos, entre los que se incluyen lagos salados y alcalinos, salinas solares, agua de mar, aguas sulfurosas y sedimentos, entre otros (Gupta et al., 2015; Oren et al., 2017).

La mayoría son arqueas halófilas extremas y requieren al menos 2,5 M de NaCl para su crecimiento. Aunque la mayoría de los miembros de este orden necesitan pH neutro para crecer, algunos lo hacen a pH ácido o alcalino. Son quimiorganotrofos, aerobios estrictos en su mayoría, pueden ser móviles o no, y exhiben morfologías de tipo bacilar, cocoide o pleomórfica. El contenido en G+C de los representantes de este orden varía entre 52 y 67 moles% (Oren et al., 2017).

1.5.1.I. Género *Halorientalis*

El género *Halorientalis* fue propuesto por Cui y colaboradores (2011) para acomodar a dos cepas aisladas de la salina solar Taibei, al este de China, descritas como *Halorientalis regularis* (Cui et al., 2011). El género *Halorientalis*, incluye además, otras dos especies: *Halorientalis persicus* (Amoozegar et al., 2014), aislada del lago hipersalino Aran-Bidgol (Irán) y *Halorientalis brevis* (Yuan et al., 2015), aislada del lago hipersalino Yuncheng (China). Este género se incluye en la familia *Haloarculaceae*, orden *Halobacteriales*, clase *Halobacteria* y phylum *Euryarchaeota* (Amoozegar et al., 2017; Oren et al., 2017).

Las células de las especies de este género son bacilos o pleomórficas, móviles y Gram-negativas. Poseen un metabolismo estrictamente aerobio y heterótrofo. Halófilas extremas, capaces de crecer en un rango de salinidad entre 15 y el 30 % de NaCl, de temperatura entre 20 y 50 °C y de pH entre 6,0 y 9,0. Catalasa y oxidasa positivas. Los lípidos polares de los miembros de este género son fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato diglicosil diéter (S-DGD-1). El contenido en G+C del ADN genómico varía entre 61,5 y 61,9 moles%, determinado experimentalmente (Cui et al., 2011).

Algunos estudios realizados mediante técnicas independientes de cultivo han demostrado la presencia de representantes del género *Halorientalis* en otros ambientes, como muestras de sedimentos y otros ambientes acuáticos hipersalinos (Youssef et al., 2012; Al-Maillem et al., 2014).

1.5.1.II. Género *Natronomonas*

El género *Natronomonas* se engloba dentro de la familia *Haloarculaceae*, en el orden *Halobacteriales*, de la clase *Halobacteria* y del phylum *Euryarchaeota*. La especie tipo del género es *Natronomonas pharaonis*, aislada a partir de salmueras alcalinas en Egipto. Esta especie fue inicialmente descrita como *Halobacterium pharaonis* (Soliman & Trüper, 1982) y reclasificada posteriormente como *Natronobacterium pharaonis* (Tindall et al., 1984), hasta su clasificación actual dentro del género *Natronomonas* (Kamekura et al., 1997). Además de la especie tipo, actualmente el género solo cuenta con otras dos especies descritas, *Natronomonas moolapensis* (Burns et al., 2010a) y *Natronomonas gomsonensis* (Kim et al., 2013), aisladas de salinas solares de Australia y Corea, respectivamente.

El género *Natronomonas* es uno de los géneros de haloarquea más antiguos y mejor conocidos, en él se han realizado numerosos estudios sobre sus rodopsinas, las

aplicaciones de éstas o el potencial biotecnológico de sus enzimas, entre otros (Stan-Lotter *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2008a, 2008b; Gradinaru *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016; Kato *et al.*, 2016; Amtul & Aziz, 2017; Sakajiri *et al.*, 2018; Fujisawa *et al.*, 2019). Se trata de un género bastante peculiar: aunque dos de sus especies son neutrófilas, *Natronomonas pharaonis*, sin embargo, es alcalófila e incapaz de crecer a valores de pH por debajo de 8,0, siendo además la primera especie halófila y alcalófila descrita. Son células Gram-negativas, presentan una morfología muy variada de bacilos muy cortos, formas cocoides y también pleomórficas. Las colonias poseen pigmentación roja. Quimiorganotrofos y aerobios, requieren al menos una concentración de 12,5 % de NaCl para crecer. Los lípidos polares mayoritarios son fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerolfosfato metil éster (PGP-Me) y ácido fosfatídico, algunos otros fosfolípidos o glicolípidos también pueden estar presentes (Burns *et al.*, 2010a). El contenido en G+C del ADN oscila entre 61,0-64,0 moles% (Kim *et al.*, 2013).

Su presencia ha sido identificada mediante técnicas independientes de cultivo en diversos ambientes hipersalinos, y en algunos casos también alcalinos, como lagos salados y alcalinos, salinas solares, suelos y sedimentos, yacimientos petrolíferos, etc. (Burns *et al.*, 2004; Sime-Ngando *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Ghai *et al.*, 2011; Boujelben *et al.*, 2012a; Oueriaghli *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014a; Sankaranarayanan *et al.*, 2014; Tazi *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; Navarro-Noya *et al.*, 2015; Dalvi *et al.*, 2016; Haferburg *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017; Vera-Gargallo & Ventosa, 2018b; Couto-Rodríguez & Montalvo-Rodríguez, 2019).

1.5.II. Orden *Haloferacales*

El orden *Haloferacales* ha sido establecido en el año 2015 (Gupta *et al.*, 2015) y recibe su nombre del género tipo *Haloferax* (Torreblanca *et al.*, 1986). En él actualmente se incluyen dos familias, *Halorubraceae* y *Haloferacaceae* (Gupta *et al.*, 2016; Oren *et al.*, 2017).

Los miembros de este orden se encuentran ampliamente distribuidos en los ambientes hipersalinos. Se caracterizan por presentar diversas morfologías, entre las que se incluyen bacilos, cocos, células pleomórficas e incluso formas cuadradas. Crecen óptimamente a un pH neutro, y muestran un metabolismo tanto heterótrofo como quimiorganotrofo. Además, algunos de los representantes de este orden son móviles o contienen vesículas de gas. El contenido en G+C del ADN de este grupo es de 55-66 moles% (Oren *et al.*, 2017).

1.5.II.1. Género *Halonotius*

El género *Halonotius* se encuentra clasificado dentro de la familia *Halorubraceae*, del orden *Haloferacales* y de la clase *Halobacteria* (Amoozegar et al., 2017), fue descrito por Burns y colaboradores en el año 2010, y, hasta la fecha, contaba con una única especie descrita, *Halonotius pteroides*. Esta especie fue descrita a partir de un grupo de cepas aisladas de las salinas de Cheetham en Australia, filogenéticamente relacionadas con secuencias abundantes en el lago Deep en la Antártida (Bowman et al., 2000). Numerosos estudios llevados a cabo mediante técnicas independientes de cultivo han identificado la presencia de este género en diversos ambientes hipersalinos, tanto acuáticos como suelos (Makhdoumi-Kakhki et al., 2012; Podell et al., 2013, 2014; Çınar & Mutlu, 2016; Rubin et al., 2017; Haferburg et al., 2017; Han et al., 2017; Vera-Gargallo & Ventosa, 2018; Ramos-Barbero et al., 2019). A partir del metagenoma del Lago Tyrrell, en Australia, incluso se han conseguido extraer dos genomas ambientales relacionados con dicho género (Podell et al., 2013).

La única especie del género *Halonotius* se caracteriza por presentar una morfología de bacilo aplanado con bordes redondeados, Gram-negativos y móviles. Son aerobios y heterótrofos, además de catalasa y oxidasa negativos (Burns et al., 2010b).

OBJETIVOS



Los ambientes hipersalinos constituyen excelentes modelos de hábitats extremos, los cuales se caracterizan por presentar un alto contenido en sales, factor entre otros, que limita la biodiversidad presente en ellos. Estos hábitats están representados fundamentalmente por sistemas acuáticos y por suelos hipersalinos. El estudio de los mismos ha dado lugar a un extenso conocimiento sobre la diversidad filogenética y funcional de los microorganismos halófilos, sus mecanismos de adaptación a altas concentraciones de sales y sus interacciones, entre otros. Asimismo, los numerosos estudios realizados, han permitido tras muchos esfuerzos, aislar y caracterizar un elevado número de los microorganismos halófilos que allí habitan, algunos de los cuales constituyen una proporción importante de las comunidades microbianas de estos ambientes.

Por otro lado, el desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación masiva y la realización de estudios metagenómicos, tanto en salinas solares como en suelos hipersalinos, han demostrado su gran potencial en el campo de la ecología microbiana, permitiendo la descripción de la comunidad de estos hábitats, así como las relaciones entre su diversidad, estructura y diversos parámetros ambientales y edáficos. Estos estudios por su parte, también han puesto de manifiesto que existe una gran biodiversidad por conocer en estos ambientes, debido fundamentalmente a la dificultad de su cultivo.

Aunque los estudios metagenómicos aporten un nivel de detalle sin precedentes, no podemos olvidar que el cultivo de microorganismos sigue siendo imprescindible, ya que establece la prueba tangible de la existencia de esos microorganismos. Además, la posibilidad de disponer de dichos microorganismos en cultivo puro constituye el método más fiable para poder llevar a cabo la caracterización completa de los mismos. Asimismo, permite obtener información detallada sobre su filogenia, metabolismo y relevancia ecológica y resulta absolutamente indispensable para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas.

En base a estos precedentes, en el presente trabajo nos propusimos continuar realizando tareas de aislamiento de nuevos microorganismos halófilos que pudieran aportar luz a esa fracción de microorganismos que aún se desconocen, con un enfoque diferente a los que se han venido utilizando hasta el momento. De este modo, se han diseñado numerosos medios y condiciones de cultivo que satisficieran los requerimientos nutricionales y de tiempo de crecimiento de las especies microbianas que pudieran estar presentes, con la finalidad de aislar y caracterizar esos grupos microbianos predominantes en los ambientes hipersalinos no descritos hasta la fecha.

Por otro lado, el gran avance en las técnicas de secuenciación genómica en los últimos años, han hecho necesaria su incorporación a los estudios taxonómicos. Por ese motivo, hemos procedido a secuenciar los genomas de todos aquellos microorganismos aislados en este trabajo que pudieran constituir nuevos taxones. Estos estudios genómicos complementan la caracterización taxonómica clásica y juntos permiten mejorar el conocimiento de estos nuevos grupos.

De forma más concreta, los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- I. Estudiar la comunidad procariota presente en muestras de agua de diferentes estanques de las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta y en muestras de un suelo salino localizado en las Marismas del Odiel, ambos localizados en la provincia de Huelva, mediante el empleo de diversas técnicas y condiciones de cultivo.
- II. Comparación de la diversidad microbiana cultivable con la descrita previamente en los estudios metagenómicos llevados a cabo en estos hábitats en concreto.
- III. Aislamiento en cultivo puro de nuevos grupos microbianos de haloarqueas y bacterias halófilas, no descritos hasta el momento, que los estudios metagenómicos han identificado como abundantes en estos ambientes hipersalinos.
- IV. Caracterización taxonómica completa de los nuevos grupos de microorganismos aislados, siguiendo las recomendaciones de los Comités Internacionales de Sistemática, que incluye el estudio de todas sus características fenotípicas, genotípicas, filogenéticas y quimiotaxonómicas, para su descripción como nuevos taxones.
- V. Secuenciación del genoma de estos nuevos microorganismos para realizar estudios de genómica comparativa, de acuerdo a los nuevos requisitos en taxonomía de procariotas, incluyendo el cálculo de los índices de relatividad (identidad aminoacídica media [AAI], identidad nucleotídica media [ANI] e hibridación ADN-ADN *in silico* [DDH]) y determinar las relaciones filogenómicas en base al número total de genes ortólogos compartidos, que confieran una clasificación e identificación más precisa de estos nuevos taxones.
- VI. Realizar estudios genómicos detallados de aquellos nuevos grupos microbianos de especial interés, que permitan acceder a toda la información contenida en su material genético y como consecuencia adquirir un conocimiento más detallado de su organización

genómica, fisiología y metabolismo, lo que resulta crucial para entender cómo se comportan estos microorganismos en su ambiente natural.

VII. Realizar estudios de ecología microbiana de estos nuevos taxones, que posibiliten estudiar la distribución y abundancia de los mismos en diversos ambientes hipersalinos de nuestro planeta mediante estudios de reclutamiento genómico y de porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas, presentes en las bases de datos metagenómicas.

MATERIAL Y MÉTODOS



III.1. Muestreos y tratamiento de las muestras

Para el aislamiento de nuevos grupos microbianos de arqueas y bacterias halófilas se llevaron a cabo en total tres muestreos en diferentes ambientes hipersalinos localizados en la provincia de Huelva. Dichos muestreos se realizaron en septiembre de 2014 y en junio de 2016. Las muestras fueron tomadas a partir de un suelo hipersalino localizado en el Paraje Natural Marismas del Odiel ($37^{\circ}12'26''\text{N } 6^{\circ}57'58''\text{O}$) y de agua de las salinas de Isla Cristina ($37^{\circ}12'30''\text{N } 7^{\circ}19'41''\text{O}$) y de Isla Bacuta ($37^{\circ}15'26''\text{N } 6^{\circ}58'50''\text{O}$) (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras estudiadas en este trabajo y sus características fisicoquímicas.

Punto de muestreo	Tipo de muestra	Designación de la muestra	Salinidad (%)	CE _{1:5} (mS/cm)	pH	Fecha muestreo
Marismas del Odiel	Suelo	SMO1	-	24,00	7,80	Septiembre 2014
Marismas del Odiel	Suelo	SMO2	-	54,50	8,90	Septiembre 2014
Marismas del Odiel	Suelo	S1	-	26,4	7,98	Junio 2016
Marismas del Odiel	Suelo	S2	-	20,3	7,90	Junio 2016
Marismas del Odiel	Suelo	S3	-	49,8	7,74	Junio 2016
Marismas del Odiel	Suelo	S4	-	39,9	7,72	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F1	23	-	7,56	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F2	34	-	7,26	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F3	23	-	7,5	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F4	23	-	7,43	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F5	32	-	7,56	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F6	31	-	7,47	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F9	31	-	7,13	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F10	10	-	7,79	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F11	19	-	7,72	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F12	31	-	7,35	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F13	27	-	7,53	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F14	30	-	7,46	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F15	31	-	7,49	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	F16	32	-	7,52	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	IC14	14	-	7,48	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	IC17	16	-	7,59	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	IC23	23	-	7,34	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	IC37	32	-	7,47	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	IC28 0,22μ	28	-	7,39	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	IC30 0,22μ	29	-	7,38	Junio 2016
Isla Cristina	Agua	IC36 0,22μ	33	-	7,45	Junio 2016
Isla Bacuta	Agua	F7	20	-	7,71	Junio 2016

Punto de muestreo	Tipo de muestra	Designación de la muestra	Salinidad (%)	CE _{1:5} (mS/cm)	pH	Fecha muestreo
Isla Bacuta	Agua	F8	32	-	7,46	Junio 2016
Isla Bacuta	Agua	F17	19	-	7,83	Junio 2016
Isla Bacuta	Agua	F18	27	-	7,51	Junio 2016
Isla Bacuta	Agua	F19	19	-	7,82	Junio 2016
Isla Bacuta	Agua	F20	17	-	7,76	Junio 2016
Isla Bacuta	Agua	IB35	30	-	7,39	Junio 2016
Isla Bacuta	Agua	IB32 0,22μ	31	-	7,68	Junio 2016

La concentración salina de las muestras de agua se determinó con un refractómetro Atago S-28, mientras que la de las muestras de suelo con un conductímetro CRISON 35+ (Hach Lange Spain) en un extracto 1:5 con agua destilada. El pH en todos los casos se determinó mediante un pHmetro CRISON GLP 21.

En cada punto de muestreo se recogieron aproximadamente 50 ml de agua o 200 g de suelo en recipientes estériles y se trasladaron al laboratorio en un corto plazo de tiempo. Una vez allí, se procedió a su siembra en diferentes medios de cultivo.

III.2. Medios de aislamiento

Con el objetivo de aislar la mayor representación posible de nuevos grupos de haloarqueas y de bacterias halófilas no descritas hasta la fecha, se utilizaron medios de cultivo previamente descritos en la literatura, utilizando en todos los casos dos salinidades diferentes, 15 y 25 %. Para conseguir la salinidad deseada en cada caso, se realizaron diluciones a partir de una solución de sales al 30 %, denominada SW₃₀. A la vez que se diseñaron nuevos medios de cultivo utilizando directamente el agua de las salinas.

Solución de sales al SW₃₀ (Subov, 1931)

Se trata de una solución de sales cuya composición mantiene proporciones relativas similares a las del agua de mar (Subov, 1931) con una pequeña disminución en las concentraciones de CaCl₂ y NaHCO₃, que se añaden por separado para evitar su precipitación. A partir de esta solución se prepararon algunos de los medios de cultivo utilizados, realizando diluciones para obtener las salinidades deseadas en cada caso.

La composición de esta solución de sales es:

NaCl	234,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	39,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	61,0 g
*CaCl ₂	1,0 g
KCl	6,0 g
*NaHCO ₃	0,2 g
NaBr	0,7 g
Agua destilada c.s.p	1000 ml

*Se disuelven por separado

La composición de los medios empleados en esta Tesis Doctoral se detalla a continuación. Todos ellos se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 20 minutos.

III.2.I. Medio R2A (Reasoner & Geldreich, 1985)

Se trata de un medio rico diseñado por Reasoner & Geldreich. (1985), que contiene diferentes fuentes de carbono. Este medio se preparó a dos salinidades diferentes, 15 y 25 %.

Su composición para 100 ml es la siguiente:

Extracto de levadura	0,05 g
Proteosa peptona n° .3	0,05 g
Casaminoácidos	0,05 g
Dextrosa	0,05 g
Almidón soluble	0,05 g
Piruvato sódico	0,03 g
Fosfato dipotásico	0,03 g
Sulfato de magnesio	0,005 g
Agua destilada	c.s.p 15 % ó 25 %
SW30	c.s.p 15 % ó 25 %

III.2.II. Medio Piruvato

Se trata de un medio suplementado con piruvato sódico (0,1 %) y digerido de caseína (0,5 %) como únicos nutrientes. Este medio se preparó a dos salinidades diferentes, 15 y 25 %.

III.2.III. Medio Glicerol

Se trata de un medio suplementado con extracto de levadura (0,01 %) y glicerol (0,1 %) como únicos nutrientes. Este medio se preparó a dos salinidades diferentes, 15 y 25 %.

En estos tres casos el pH del medio se ajustó a 7,5 con NaOH 1 M y se añadió agar purificado (Oxoid) a una concentración del 2 %, cuando fue necesario.

III.2.IV. Medios con extractos

Se trata de una serie de medios empleados en este trabajo con el propósito de aislar nuevos grupos microbianos. Para ello, se emplearon diferentes metodologías en función del tipo de extracto utilizado (agua o suelo), con el objetivo de que la composición química de los medios de cultivo fuera lo más parecida posible a la ambiental.

En el caso de los medios preparados con **agua salinas**, se utilizó agua de las salinas filtrada (0,22 μm), a la cual se le añadió extracto de levadura (0,05 %) como nutriente. El pH y la salinidad original de la muestra se mantuvieron.

En el caso de los medios preparados con **extracto de suelo**, se siguió la metodología descrita por Hamaki *et al.*, 2005. Se pesaron 250 g de suelo y se disolvieron en 500 ml de NaOH 50 mM, dejándose decantar toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se filtró, y se añadieron las sales necesarias para obtener una salinidad del 15 y del 25 %. El pH de la muestra se mantuvo.

En estos casos, los medios se solidificaron utilizando agarosa (Seaken, LE Agarose) al 2 %.

III.3. Tratamiento de las muestras y aislamiento de cepas

Una vez en el laboratorio, se procedió a la siembra de las muestras en los diferentes medios de cultivo preparados. Para ello se actuó de diferente manera en función del tipo de muestra.

Muestras de agua: Se realizaron diluciones seriadas al décimo a partir de las muestras hasta la dilución 10^{-2} , en solución salina estéril al 15 y 25 %, en función del medio de cultivo en el que iban a ser sembradas. Dichas diluciones, al igual que las muestras directas, se inocularon en los diferentes medios de cultivo mediante siembra con espátula (100 μl /placa).

Muestras de suelo: Se pesó un gramo de muestra y se suspendió en 5 ml de solución salina estéril al 15 y 25 %, en función del medio de cultivo en el que iban a ser sembradas, y se agitó mediante Vortex durante cinco minutos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas al décimo hasta la dilución 10^{-3} para cada una de las salinidades, y se inocularon 100 µl de cada una de las diluciones en los distintos medios de cultivo mediante siembra con espátula (100 µl/placa).

Las placas ya inoculadas se incubaron a 37 °C durante más de dos meses, protegidas en bolsas de plástico perfectamente cerradas, con el fin de evitar la evaporación y desecación del medio. A lo largo del período de incubación, se fueron observando los distintos tipos de colonias y marcando aquellas de crecimiento más rápido y primera aparición. Tras dicho período, se seleccionaron aquellas colonias de crecimiento más tardío, que no habían sido marcadas previamente y que además pudieran pasar desapercibidas a simple vista debido a su menor tamaño y apenas pigmentación. Dichas colonias se purificaron mediante siembras sucesivas en el mismo medio de aislamiento hasta obtener cultivos puros.

III.4. Material biológico

III.4.I. Cepas aisladas

Durante el presente trabajo se aislaron un total de 2085 cepas en cultivo puro, de las cuales han sido identificadas un total de 254, donde 209 corresponden a cepas de haloarqueas y 45 a cepas de bacterias halófilas. El resto de cepas se conservan en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla) para futuros estudios.

III.4.II. Cepas de colección

En este trabajo se han utilizado como referencia un total de 13 cepas provenientes de diferentes colecciones de cultivo, que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cepas de colección utilizadas en este trabajo.

Cepa	Referencia
<i>Halonotius pteroides</i> CECT 7525 ^T	Burns <i>et al.</i> (2010b)
<i>Natronomonas pharaonis</i> CECT 4578 ^T	Soliman & Truper (1982)
<i>Natronomonas moolapensis</i> CECT 7526 ^T	Burns <i>et al.</i> (2010a)
<i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T	Amoozegar <i>et al.</i> (2014)
<i>Halorientalis regularis</i> JCM 16425 ^T	Cui <i>et al.</i> (2011)
<i>Halomicroarcula pellucida</i> CECT 7537 ^T	Echigo <i>et al.</i> (2013)

Cepa	Referencia
<i>Halomicroarcula limicola</i> JCM 18640 ^T	Zhang & Cui (2014)
<i>Halomicroarcula salina</i> JCM 18369 ^T	Zhang & Cui (2015)
<i>Halobacterium salinarum</i> DSM 3754 ^T	Harrison & Kennedy (1922)
<i>Halorubrum saccharovorum</i> DSM 1137 ^T	Tomlinson & Hochstein (1976)
<i>Halovenus aranensis</i> IBRC-M 10015 ^T	Makhdoumi-Kakhki <i>et al.</i> (2012)
<i>Halohasta litorea</i> JCM 17270 ^T	Mou <i>et al.</i> (2012)
<i>Halohasta litchfieldiae</i> JCM 15066 ^T	Mou <i>et al.</i> (2012)

III.4.III. Cultivo, mantenimiento y conservación de las cepas

Todas las cepas aisladas y caracterizadas en este trabajo, a excepción de las cepas F16-60^T y F13-25^T, se han cultivado rutinariamente en medio R2A al 25 % de sales (ver apartado III.2.II.). Dichas cepas se cultivaron en los medios DBCM2 (detallado a continuación) y en el suplementado con glicerol al 25 % de sales (ver apartado III.2.IV), respectivamente.

Medio DBCM2

Debido a que la cepa F16-60^T, objeto de estudio en este trabajo, se aisló a partir de uno de los medios preparados con extractos, su posterior cultivo y mantenimiento no pudo llevarse a cabo en el mismo al no disponerse de más muestra.

El cultivo rutinario de esta cepa se llevó a cabo en el medio DBCM2, cuya composición se detalla a continuación:

Piruvato sódico	0,11 g
Medio MHE 25	2,5 ml
Agua destilada	16,67 ml
SW30	83,33 ml

Dónde la composición del medio MHE 25 es:

Glucosa	0,1 g
Peptona	0,5 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	16,67 ml
SW30	83,33 ml

El pH se ajustó a 7,2. Se añadió agar (iNtRON Biotechnology®) al 2 % cuando fue necesario.

La conservación de todas las cepas se llevó a cabo de forma rutinaria mediante siembras en tubos de agar inclinado en los diferentes medios de cultivo óptimos para cada microorganismo. Asimismo, paralelamente, para su conservación a largo plazo, las cepas se congelaron a -80 °C en el medio adecuado conteniendo glicerol al 20 %, en relación 1:1 cultivo/glicerol 40 %.

III.5. Estudio filogenético de las cepas aisladas

En primer lugar, con el objetivo de determinar la posición filogenética de cada una de las cepas aisladas, se realizó la amplificación y secuenciación parcial del gen ARNr 16S, únicamente con un cebador, el F27 en el caso de bacterias halófilas y el F21 en el caso de las haloarqueas (ver apartado III.5.II.).

Una vez obtenidas las secuencias parciales, de aproximadamente 700 pb, estas se compararon con las secuencias disponibles en las bases de datos con la ayuda del programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information) y la aplicación Ez-BioCloud (Yoon *et al.*, 2017) (ver apartado III.5.V.II.). Los resultados de estos análisis se utilizaron para llevar a cabo el estudio sobre la biodiversidad cultivable. Para la representación gráfica de estos resultados se utilizó el software Krona (Ondov *et al.*, 2011). Aquellas cepas cuyas secuencias parciales del gen ARNr 16S presentaron valores de semejanza con respecto a las secuencias disponibles de las cepas tipo de especies ya descritas, inferiores al 97-98 % o al 95 % (valores límites para considerar una cepa como una posible nueva especie [Stackebrandt y Goebel, 1994] o un nuevo género [Ludwig *et al.* 1998], respectivamente), se preseleccionaron con el objetivo de llevar a cabo un estudio más exhaustivo de cada una de ellas.

Para determinar la posición filogenética más detallada de estas cepas preseleccionadas, se procedió a la amplificación y secuenciación completa del gen ARNr 16S de las mismas. Dichas secuencias, volvieron a ser comparadas con las disponibles en las bases de datos, siendo finalmente seleccionadas para este estudio aquellas cepas cuyas secuencias completas del gen ARNr 16S (de aproximadamente 1400 pb) presentaron un porcentaje de semejanza igual o inferior al 98,6 %.

Posteriormente, debido a las limitaciones del gen ARNr 16S en el caso de las haloarqueas (Boucher *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2013), a estas cepas preseleccionadas se les realizó la secuenciación del gen esencial (*housekeeping*) *rpoB*' (ver apartado III.5.II.).

III.5.I. Extracción, purificación y determinación de la concentración y pureza del ADN

III.5.I.I. Método de Marmur modificado

Para la extracción del ADN genómico que se utilizó tanto para la amplificación del gen ARNr 16S o *rpoB* como para la secuenciación del genoma de las diferentes cepas, se utilizó una modificación a pequeña escala del método Marmur (1961).

El protocolo seguido fue el que se muestra a continuación:

1. Obtención de células: centrifugar aproximadamente 3 ml de cultivo durante 2 minutos a 13.000 rpm y eliminar el sobrenadante
2. Lavado de células: añadir al *pellet* 500 µl de EDTA salino, pH 8,0
3. Incubar durante 30 minutos a 37 °C en un termobloque
4. Lisis celular:
 - a) Añadir 50 µl de SDS al 25 % en agua destilada
 - b) Incubar en un termobloque a 60 °C durante 10 minutos
 - c) Añadir 120 µl de perclorato sódico 5M
5. Desproteinización:
 - a) Añadir 800 µl de una mezcla de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1)
 - b) Agitar vigorosamente durante 30 minutos mediante Vortex
 - c) Centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm
 - d) Extraer el sobrenadante *et alocar* en un tubo limpio
6. Precipitación del ADN:
 - a) Añadir 1,2 ml de etanol puro frío
 - b) Invertir el tubo 3 o 4 veces
 - c) Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm
 - d) Desechar el sobrenadante
7. Lavado del ADN:
 - a) Añadir 500 µl de etanol al 70 %
 - b) Centrifugar durante 3 minutos a 13.000 rpm
 - c) Desechar el sobrenadante
8. Dejar secar el *pellet* unos minutos
9. Resuspender el *pellet* en 50 µl de agua miliQ estéril

EDTA salino: EDTA, 33,62 g; NaCl, 8,7 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml. pH 8,0

SDS 25 %: Solución de dodecil sulfato sódico al 25 % (p/v) en agua destilada

NaClO₄ 5 M (perclorato sódico): NaClO₄ 702,3 g; agua destilada c.s.p. 1000 ml

III.5.I.II. Purificación del ADN genómico

Una vez extraído, el ADN fue purificado utilizando un kit comercial de purificación MEGAquick-spin™ plus (iNtRON Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.5.I.III. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis de ADN en geles horizontales de agarosa es una técnica ampliamente utilizada que nos permite visualizar la integridad del ADN extraído, así como separar e identificar los distintos fragmentos de ADN en función de su tamaño, para poder comprobar la amplificación por PCR de dichos fragmentos.

El fundamento de la técnica de electroforesis se basa en la carga negativa que poseen las moléculas de ADN en los grupos fosfato, propiedad por la cual migran hacia el polo positivo cuando se someten a un campo eléctrico. El gel de agarosa actúa como una matriz que permite separar estas moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. De este modo, los fragmentos pequeños de ADN migrarán más rápido hacia el polo positivo mientras que las moléculas más grandes quedarán más cerca del polo negativo.

Para llevar a cabo la electroforesis, se prepararon geles de agarosa (Seaken, LE Agarose) a una concentración 1 % (p/v) en tampón TAE 1x (preparado a partir de TAE 50x) y sumergidos en ese mismo tampón en la cubeta de electroforesis. Los geles de agarosa se tiñeron con 3 µl de RedSafe 20.000x (iNtRON Biotechnology) para la visualización del ADN, el cual se intercala en la doble cadena del ADN y permite su visualización tras la exposición del gel a la luz UV a 360 nm (Sambrook & Russell, 2001), mediante el uso de un transiluminador (TFP-M/WL).

Para cargar las muestras de ADN en el gel, se realizaron diluciones de las muestras en tampón de carga 6x en una proporción 2:4; se utilizó un patrón de pesos moleculares de 1 kb (Invitrogen) y se aplicó una corriente eléctrica de 60 V durante 40 minutos.

Tampón TAE 50x: ácido acético glacial, 57,1 ml; EDTA 50 mM, pH 8,0; tris-base, 242 g; agua destilada, c.s.p. 1000 ml.

Tampón TAE 1x: TAE 50x, 20 ml; agua destilada, 980 ml.

Tampón de carga 6x: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v); sacarosa 40 % (p/v); xilén-cianol 0,25 % (p/v).

III.5.I.IV. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Para la determinación de la concentración de ADN se utilizó el método de cuantificación por fluorimetría, que se basa en la unión específica de un fluoróforo a las moléculas de ADN de doble cadena intactas. En concreto se utilizó un fluorímetro Qubit® dsDNA 3.0 (ThermoFisher Scientific). Dado que dicho método no permite la determinación de la pureza del ADN, se utilizaron también métodos espectrofotométricos que permitieran dicha determinación.

Los métodos espectrofotométricos se basan en que los nucleótidos y otras sustancias contaminantes (proteínas, compuestos fenólicos, etc.) absorben energía a longitudes de ondas específicas. Mientras que el ADN absorbe a 260 nm, los contaminantes orgánicos y las sales absorben a 230 nm, y las proteínas y compuestos fenólicos lo hacen a 280 nm, respectivamente. En concreto se utilizó un espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX (DeNovix Technologies), que mide la absorbancia a 230, 260 y 280 nm, calculando los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} entre dichos valores. Una muestra de ADN se considera pura cuando los cocientes A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} son 1,8 y 2,0, respectivamente (Desjardins & Conklin, 2011).

Aunque los métodos espectrofotométricos también permiten la cuantificación del ADN, la cuantificación de ADN por fluorimetría es preferible a la de espectrofotometría, ya que únicamente considera ADN de doble cadena de buena calidad (Nakayama *et al.*, 2016).

III.5.II. Amplificación del ADN mediante PCR

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método ampliamente utilizado que nos permite de una manera rápida y sencilla amplificar ácidos nucleicos (Mullis & Faloona, 1987). Se basa en el proceso natural de la replicación del ADN en el que el número de moléculas de ADN formadas aumenta exponencialmente. Para ello se necesitan dos cebadores o *primers*, diseñados al efecto, los cuales son complementarios a las secuencias de las hebras opuestas del ADN diana, situadas justo en los extremos del segmento que se quiere amplificar. La distancia entre ellos determinará la longitud de la secuencia de ADN amplificada en cada caso.

Para la amplificación de los genes de interés, se empleó la técnica de la PCR siguiendo las indicaciones de Sambrook & Russell (2001), utilizando el termociclador Mastercycler Ep (Eppendorf).

Los distintos cebadores que se han utilizado en este trabajo para las reacciones de amplificación mediante PCR se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes ARNr 16S de bacterias y arqueas y del gen *rpoB'* de arqueas. Las secuencias de los cebadores se muestran de acuerdo con el código de la IUPAC para la denominación de nucleótidos ambiguos. La posición de los cebadores se indica con respecto a la numeración de *Escherichia coli*.

Cebador	Gen que amplifica	Especificidad	Orientación	Secuencia 5' → 3'	Posición
16F27	ARNr 16S	Bacterias	Directo	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	8-27
16R1488	ARNr 16S	Bacterias	Reverso	CGG TTA CCT TGT TAG GAC TTC ACC	1511-1488
16F21	ARNr 16S	Arqueas	Directo	TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA	7-26
16R1492	ARNr 16S	Universal	Reverso	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	1509-1491
rpoBF	RNA polimerasa cadena β (<i>rpoB'</i>)	Arqueas	Directo	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCG AAG AGC CGG ACG ACA TGG	962-1001
rpoBR	RNA polimerasa cadena β (<i>rpoB'</i>)	Arqueas	Reverso	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGT CAG CAC CTG BAC CGG NCC	1504-1466

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 50 µl utilizando tubos de microcentrífuga de 0,2 ml estériles.

A continuación se muestra el protocolo general de las reacciones de PCR:

Tampón de reacción 10x	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTPs (1,25 mM cada dNTP)	8,0 µl
Cebador directo (12 µM)	2,5 µl
Cebador reverso (12 µM)	2,5 µl
ADN (50 ng)	1,0 µl
Taq ADN polimerasa (5 U/µl)	0,5 µl
Agua estéril c.s.p	50 µl

La enzima empleada en todos los casos fue la ADN polimerasa modificada de *Thermus aquaticus* (Lawyer et al., 1989), Taq ADN polimerasa (iNtRON Biotechnology).

De forma general, las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo siguiendo el siguiente esquema y tal y como se detalla en las Figuras 10 y 11:

- Desnaturalización del ADN molde: 5 minutos a 95 °C en el caso del gen ARNr 16S y 1 minuto a 94 °C en el caso del gen *rpoB'*.

- 25-35 ciclos en los que se repiten tres fases:
 - Desnaturalización: 60 segundos a 94 °C, en el caso del gen ARNr 16S y a 98 °C, en el caso del gen *rpoB*'.
 - Hibridación de los cebadores: normalmente la temperatura de hibridación es 5 °C menor que la temperatura media de desnaturalización (T_m) más baja de los dos cebadores. Se utilizó 50 °C para el gen ARNr 16S y 61 °C para el gen *rpoB*', durante 60 segundos.
 - Elongación: Se recomienda una temperatura de 68 a 72 °C y un tiempo de 1 min/kb.
- Elongación final: 10 minutos a 72 °C para el gen ARNr 16S y 5 minutos a 72 °C para el gen *rpoB*', con el objetivo de conseguir la elongación completa de los productos de la reacción.
- Finalmente, las muestras se conservaron a 4 °C

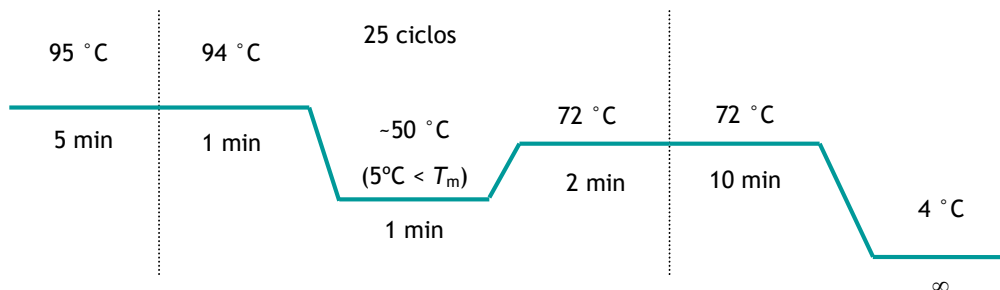


Figura 10. Esquema general de las reacciones de PCR del gen ARNr 16S.

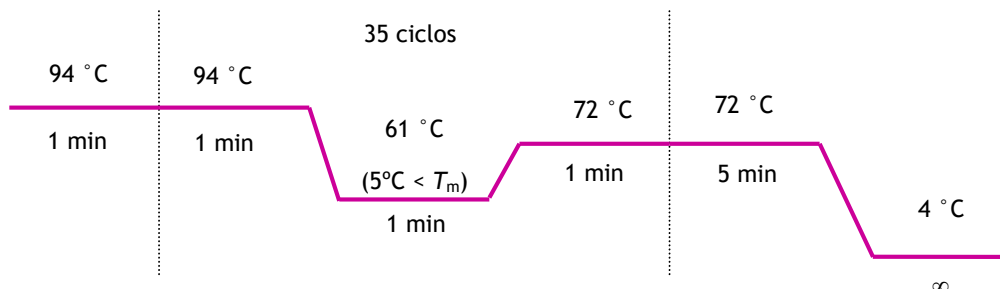


Figura 11. Esquema general de las reacciones de PCR del gen *rpoB*'.

Para comprobar la correcta amplificación del ADN se procedió a la visualización de los fragmentos de ADN sometiendo una alícuota de producto de PCR (2 µl) a una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (ver apartado III.5.I.III). Finalmente, estos fragmentos se purificaron utilizando el kit de purificación MEGAquick-spin™ plus (iNtRON Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.5.III. Estudios de clonación

Como ya se ha comentado previamente, a pesar de que el gen ARNr 16S es el marcador filogenético por excelencia, este gen presenta algunas limitaciones, ya que la mayoría de las especies procariotas presentan dos o más copias del operón ARNr, pudiendo no ser idénticas, y en algunos casos incluso con una divergencia entre ellas superior al 5 %, suficiente como para considerar el mismo microorganismo como dos especies distintas (Acinas et al., 2004; Boucher et al., 2004).

Un ejemplo es el género *Halorientalis*, en el cual han sido identificadas dos copias diferentes de este gen. Esto determinó la necesidad de llevar a cabo experimentos de clonación para el estudio de la cepa F13-25^T, relacionadas con dicho género, que permitieran la identificación de las diferentes copias de dicho gen en este microorganismo.

III.5.III.I. Protocolo de ligación

En primer lugar se llevó a cabo la ligación del ADN amplificado por PCR utilizando para ello el kit comercial pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). El protocolo seguido se describe a continuación y se dejó incubar toda la noche.

Tampón de ligación 2x	5,0 µl
pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1,0 µl
Producto de PCR	3,0 µl
T4 ADN ligasa	1,0 µl
Agua libre de nucleasas c.s.p	10 µl

El sistema pGEM®-T (3,0 kb) (Figura 12) es un vector de clonación que posee un marcador de resistencia a la ampicilina. Contiene promotores de las ARN polimerasas T7 y SP6, las cuales flanquean una región de clonación múltiple en mitad del gen *lacZ*, codificante de la enzima β-galactosidasa. En esta región se produce la incorporación del inserto a clonar durante el proceso de ligación.

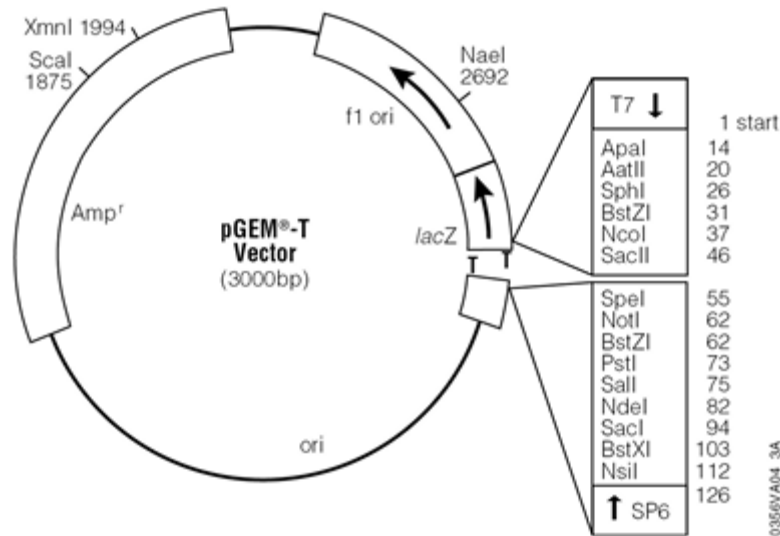


Figura 12. Representación gráfica del vector de clonación pGEM®-T.

III.5.III.II. Transformación de células competentes por choque térmico

Una vez concluido el proceso de ligación, se procedió a la transformación del producto ligado en células competentes de *Escherichia coli* JM109, las cuales captan este ADN ligado y lo incorporan a su material genético como propio. Para ello se siguió el protocolo descrito a continuación:

Protocolo de transformación

1. Se extrae un vial con 50 µl de células competentes DH5α congeladas a -80 °C y se coloca en hielo para su descongelación lenta
2. Una vez descongeladas las células, se les añade el ADN a transformar (1-5 µl) y se mantienen 30 minutos en hielo
3. A continuación, se procede al choque térmico durante 45 segundos a 42 °C, e inmediatamente se vuelven a colocar en hielo durante 2 minutos
4. Tras el choque térmico, se añade 1 ml de medio LB y se deja incubar a 37 °C con agitación lenta durante una hora
5. Transcurrido ese tiempo, se siembran alícuotas de 50, 100 y 200 µl en placas de LB adicionadas con ampicilina, y a las que se le añaden 40 µl del inductor IPTG

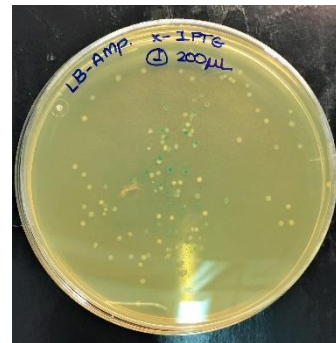


Figura 13. Observación de la apariencia coloreada de las colonias a las 24 horas.

(20 µg/ml) y 20 µl del sustrato cromogénico X-Gal (40 µg/ml), con el fin de identificar los clones que han añadido el inserto

6. Las placas se dejan incubar toda la noche a 37 °C y se observaron al día siguiente, dónde aparecieron colonias blancas y azules (Figura 13)

Medio LB: Bacto triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), NaCl (10 g/l) y H₂O estéril c.s.p. 1000 ml

Medio LB-Ampicilina: Al medio LB autoclado y a una temperatura de aproximadamente 50 °C, se le añade una solución de ampicilina (100 mg/ml) para conseguir una concentración final de 150 µg/ml

IPTG: Pesar 0,02 g de IPTG y disolver en 1 ml de H₂O destilada y estéril. Conservar a -20 °C

X-Gal: Pesar 0,04 g de X-Gal y disolver en 1 ml de dimetilformamida. Conservar a -20 °C, protegido de la luz

De forma natural, la bacteria *Escherichia coli* es sensible a la ampicilina, por lo que al añadir antibiótico al medio sólido, nos aseguramos que sólo crezcan en la placa aquellas células que hayan incorporado el plásmido. Por su parte, el compuesto X-Gal es hidrolizado por la enzima β-galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol. Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble. De esta manera, las bacterias correctamente transformadas que portan el plásmido con el gen ARNr 16S no son capaces de producir la enzima β-galactosidasa, ya que este ha sido introducido en mitad de la región *lacZ*. De esta manera, no pueden procesar el compuesto X-Gal y permanecen con su coloración blanca natural. Aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido pero éste no contengan la secuencia recombinante pueden hidrolizar el X-Gal presente en el medio, dando lugar a colonias de pigmentación azul.

III.5.III.III. Extracción del ADN plasmídico

De entre aquellas colonias que presentaron una pigmentación blanca, debido a la interrupción del gen *lacZ* por la presencia del inserto, se seleccionaron al azar un total de 20, las cuales se inocularon en medio líquido LB suplementado con ampicilina (100 mg/ml). Una vez crecidas, se procedió a la extracción del ADN plasmídico siguiendo el método de Minipreps (Riggs & McLachlan, 1986), que permite extraer el ADN plasmídico de un elevado número de colonias en poco tiempo.

Protocolo

1. Se toma una colonia con un palillo estéril y se siembra en una placa de LB/Ampicilina/IPTG/X-Gal, inoculando con el mismo palillo un tubo *eppendorf* que contiene 1,2 ml de medio LB con ampicilina. Este proceso se repite con todas las

- colonias que se quieren analizar y se incuban a 37 °C en agitación durante 10-15 horas
2. Una vez crecido, el cultivo se centrifuga a temperatura ambiente a 7000 rpm durante 3 minutos. Seguidamente, se desecha el sobrenadante y se añade al tubo 200 µl de una mezcla compuesta por 10 ml de solución de lisis y 750 µl de lisozima (10 mg/ml)
 3. Resuspendemos las células en la solución de lisis con la ayuda de un agitador Vortex durante 30 segundos
 4. A continuación, se hierve el conjunto durante 40 segundos y se centrifuga 5 minutos a 12000 rpm y temperatura ambiente
 5. Eliminamos el sedimento mucoso con un palillo estéril
 6. A cada tubo se añaden 20 µl de acetato sódico 3 M y seguidamente se precipita el ADN con 250 µl de isopropanol
 7. La mezcla se incuba a -20 °C durante 15 minutos y a continuación se centrifuga 20 minutos a 12000 rpm y a 4 °C
 8. El precipitado se lava con 1 ml de etanol al 70 % a temperatura ambiente, se seca al vacío y se resuspende finalmente en 30 µl de tampón TE

Solución de lisis: Sacarosa 1 M, 23,39 ml, Tritón X-100, 0,5 ml, EDTA 0,5 M pH 8,0, 10 ml, Tris HCl 1 M pH 8,0, 1 ml, agua destilada c.s.p. 100 ml

Tampón TE: Tris HCl 10 mM pH 9,0, EDTA, 1 mM pH 8,0

Medio LB: Bacto triptona (10 g/l), extracto de levadura (5 g/l), NaCl (10 g/l) y H₂O estéril c.s.p. 1000 ml

Una vez se extrajo el ADN plasmídico, se comprobó su extracción mediante electroforesis en gel de agarosa (apartado III.5.I.III.) y se procedió a su digestión con la enzima de restricción Eco R1 para comprobar el éxito de la clonación. Se seleccionaron las colonias que presentaban el inserto de PCR (1500 pb), y se volvió a extraer el ADN plasmídico de todas ellas, utilizando en este caso el kit DNA-spin™ (iNtRON Biotechnology), que permite obtener ADN purificado de mejor calidad. Posteriormente, este ADN fue secuenciado por la empresa STABVida (Oeiras, Portugal), utilizando los cebadores T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') y SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'). Las secuencias así obtenidas se analizaron como se describe en los apartados III.5.V.I., III.5.V.II y III.5.V.III.

III.5.IV. Secuenciación de los productos de PCR

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR en este trabajo han sido secuenciados por las empresas NBT-NewBiotechnic (Sevilla) y STABVida (Oeiras, Portugal), mediante el uso de secuenciadores automáticos ABI 3130XL y ABI 3730 XL (Applied Biosystems), respectivamente.

Los cebadores utilizados para la secuenciación de estos fragmentos de ADN se detallan en la Tabla 6. En primer lugar, se realizó la secuenciación parcial del gen ARNr 16S, para la que se utilizó el cebador F27 en el caso de bacterias halófilas, y F21 en el caso de las haloarqueas. Para las cepas de interés seleccionadas, se realizó la secuenciación completa del gen ARNr 16S, utilizando adicionalmente los cebadores R1488, F530 y R343 (Tabla 6), en el caso de bacterias halófilas, y R1492, B36 y D34 (Tabla 6), en el caso de haloarqueas. Los cebadores utilizados para la secuenciación del gen *rpoB'* fueron los mismos que se utilizaron para su amplificación (*rpoBF* y *rpoBR*), ya detallados en la Tabla 5. La secuenciación de estos cebadores permite obtener un solapamiento completo de las secuencias parciales y poder de esta forma obtener la secuencia completa del gen (Figuras 14 y 15).

Tabla 6. Cebadores utilizados para la secuenciación del gen ARNr 16S de bacterias y arqueas. Las secuencias de los cebadores se muestran de acuerdo al código de la IUPAC para la denominación de nucleótidos ambiguos. La posición de los cebadores se indica con respecto a la numeración de *Escherichia coli*.

Cebador	Especificidad	Orientación	Secuencia 5'→3'	Posición
16F21	Arqueas	Directo	TTC CGG TTG ATC CTG CCG GA	7-26
16R1492	Universal	Reverso	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	1509-1491
16FB36	Arqueas	Reverso	GGA CTA CCA GGG TAT CTA	789-806
16FD34	Arqueas	Reverso	GGT CTC GCT CGT TGC CTG	1096-1113
16F27	Bacterias	Directo	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	8-27
16R1488	Bacterias	Reverso	CGG TTA CCT TGT TAG GAC TTC ACC	1511-1488
F530	Bacterias	Directo	GTG CCA GCA GCC GCG G	515-530
R343	Bacterias	Reverso	ACT GCT GCC TCC CGT A	358-343

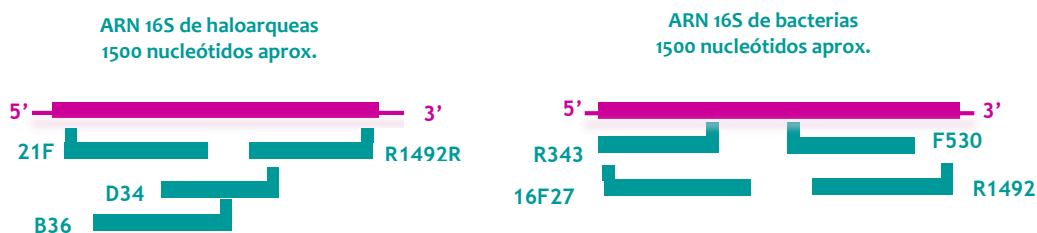


Figura 14. Estrategia seguida para el solapamiento de los cebadores utilizados en la secuenciación del gen ARNr 16S.



Figura 15. Estrategia seguida para el solapamiento de los cebadores utilizados en la secuenciación del gen *rpoB'*.

III.5.V. Análisis filogenético de las secuencias

Para realizar el estudio filogenético se utilizaron tanto las secuencias obtenidas en este trabajo como las secuencias disponibles en las bases de datos públicas (EMBL, GenBank, DDBJ y Silva). En concreto, siempre que fue posible, se utilizaron las secuencias correspondientes a las cepas tipo de las especies cuyos nombres habían sido válidamente publicados.

Para el análisis filogenético se utilizaron diferentes programas bioinformáticos que se detallan a continuación.

III.5.V.I. ChromasPro

ChromasPro es un programa de edición y análisis de secuencias. Entre otras funciones, permite abrir y guardar secuencias en múltiples formatos (Fasta, fastq, EMBL, GenBank o SwissProt, entre otros), para conseguir el solapamiento de varias secuencias en una única secuencia consenso, mostrando automáticamente ambigüedades que pueden ser editadas manualmente, generar secuencias reversas y/o complementarias y crear cromatogramas de una secuencia dada.

De esta forma, las secuencias parciales obtenidas de los genes ARNr 16S y *rpoB* se ensamblaron con la ayuda del programa ChromasPro versión 1.5 (Technelysium Pty Ltd.), corrigiéndose manualmente aquellas indeterminaciones o posiciones ambiguas, obteniéndose así la secuencia completa de dichos genes.

III.5.V.II. BLAST y Ez-Biocloud

Las secuencias parciales o completas del gen ARNr 16S y del gen *rpoB* obtenidas se analizaron mediante la comparación de las mismas con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas (EMBL, GenBank y DDBJ), con la ayuda del programa BLAST (Altschul et al., 1990) del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Asimismo, en el caso del gen ARNr 16S también se utilizó la aplicación Ez-BioCloud (Yoon et al., 2017) (<https://www.ezbiocloud.net/identify>).

III.5.V.III. ARB

El análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S se llevó a cabo empleando el programa ARB (Ludwig et al., 1998, 2004), a través de la plataforma virtual NX Client 3.5.0.0. Se trata de un proyecto creado en 1992 como una iniciativa entre el Departamento de Microbiología y la Facultad de Informática de la Universidad Técnica de Múnich y que actualmente continúa en colaboración con el grupo “Microbial Genomics and Bioinformatics” en el Max-Planck Institute for Marine Microbiology, en Bremen.

El software ARB es un paquete bioinformático orientado de una forma gráfica que comprende varias herramientas para el manejo de bases de datos de secuencias y análisis de los datos (Ludwig et al., 2004). Se nutre de la base de datos de secuencias de ARNr 16S de Silva (<http://www.arb-silva.de/>), la cual es periódicamente actualizada y contiene secuencias de calidad comprobada.

Con la ayuda del programa integrado en el paquete ARB, Fast Aligner v.1.03., las secuencias del gen ARNr 16S se alinearon con las de las cepas tipo de las especies filogenéticamente más relacionadas, atendiendo tanto a la estructura primaria como a la estructura secundaria de la molécula de ARNr 16S (Woese et al., 1983; Gutell et al., 1985; Ludwig & Schleifer, 1994, 1999). Posteriormente, estos alineamientos se revisaron de forma manual.

Una vez revisados los alineamientos, se construyeron los correspondientes árboles filogenéticos y se obtuvieron las matrices de distancia. Para ello se empleó el filtro *termini*, que elimina las posiciones conservadas en menos de un 50 %. Los valores de distancia se corrigieron por cambios de bases múltiples en posiciones sencillas mediante la fórmula de Jukes & Cantor, 1969. Los árboles fueron contruidos en base a tres algoritmos: *neighbour-joining* (Saitou & Nei, 1987), *maximum-parsimony* (Kluge & Farris, 1969) y *maximum-likelihood* (Felsenstein, 1981), y enraizados utilizando una secuencia de referencia como *outgroup*. Cada uno de estos algoritmos presenta argumentos a favor y en contra; sin embargo, el método *maximum-likelihood* muestra una serie de ventajas frente a los otros dos, ya que analiza de un modo más eficiente la información filogenética contenida en el alineamiento múltiple, generando así un resultado más real (Serdoz et al., 2017; Wiebel et al. 2017). La importancia de realizar un estudio multimetodológico radica en que a pesar de que cada uno de estos algoritmos presenta un modelo evolutivo diferente, la topología de los árboles contruidos en base a ellos debe mantenerse estable. La estabilidad de cada una de las ramas filogenéticas se calculó mediante una estimación de los valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985).

III.5.V.IV. BioEdit

Para el alineamiento de las secuencias del gen *rpoB'* de las cepas estudiadas con las de las cepas tipo de las especies filogenéticamente más relacionadas, se empleó el programa BioEdit versión 3.3.19.0 (Hall, 1999).

BioEdit es un programa de interfaz gráfica que ofrece una gran variedad de herramientas para el alineamiento de secuencias de aminoácidos o proteínas, el cual permite realizar modificaciones manuales. Acepta una gran variedad de formatos y cuenta con la integración de ClustalW y BLAST.

III.5.V.V. MEGA

La construcción de los árboles filogenéticos en base al gen *rpoB'*, se llevó a cabo utilizando el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

El programa MEGA permite la construcción de árboles filogenéticos a partir de alineamientos de secuencias de ADN o de proteínas, permitiendo así, llevar a cabo análisis evolutivos moleculares y determinar la historia filogenética del organismo en cuestión.

III.6. Caracterización quimiotaxonómica de las cepas aisladas

El estudio comparativo de la composición de los lípidos polares de las haloarqueas ha resultado ser una herramienta quimiotaxonómica útil para la clasificación de este grupo, especialmente a nivel de género, ya que el tipo de glicolípido presente es constante en la mayoría de las especies (Kates, 1986; Torreblanca *et al.*, 1986; Grant & Larsen, 1989; Oren *et al.* 2009).

III.6.I. Extracción de lípidos polares

La extracción de los lípidos polares de las cepas objeto de estudio se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Bligh & Dyer (1959) y modificado para haloarqueas (Corral, 2013).

Protocolo de extracción de lípidos polares

1. Centrifugar 1 litro de cultivo líquido bien crecido a 7000 rpm durante 10 minutos, eliminar el sobrenadante y mantener el *pellet*
2. Resuspender las células en solución salina basal, volver a centrifugar y eliminar el sobrenadante
3. Resuspender las células en un pequeño volumen de solución salina basal (1-2 ml)
4. Para extraer los lípidos es necesario crear una monofase: medir el volumen de las células resuspendidas y hacer la siguiente proporción: 0,8:2:1 (suspensión de células/metanol/cloroformo, respectivamente)
5. Agitar durante 15 minutos por inversión, para homogeneizar lo máximo posible.
6. Centrifugar a 6000 rpm durante 6 minutos
7. Recolectar el sobrenadante (sobrenadante 1) cuidadosamente con una pipeta Pasteur de cristal
8. El resto celular residual que queda en el tubo se resuspende en 0,8 ml de solución salina basal, y posteriormente se añaden 2 ml de metanol y 1 ml de cloroformo, con el fin de extraer lípidos residuales
9. Mezclar y centrifugar a 6000 rpm durante 6 minutos
10. Recolectar el sobrenadante (sobrenadante 2). Unir al sobrenadante 1 obtenido en el paso 7
Si el resto celular sigue aún pigmentado se debe repetir la extracción (pasos 8 y 9), para extraer la máxima cantidad posible de lípidos.
11. Añadir al sobrenadante (sobrenadantes 1 y 2): 2 ml de cloroformo y 2 ml de KCl 0.2 M (el KCl se utiliza para reducir y compactar la interfase que aparece al añadir el cloroformo)
12. Agitar y centrifugar a 6000 rpm durante 6 minutos
13. En el tubo aparece claramente una bifase. Extraemos con una pipeta de vidrio la fase inferior (cloroformo) donde están los lípidos
14. Secar el extracto de lípidos totales disueltos en cloroformo en una centrífuga de vacío “*speed-vac*”
15. Resuspender el extracto seco de lípidos con cloroformo a una concentración conocida
16. Almacenar a -20 °C

Solución salina basal: NaCl, 250 g, KCl, 2 g, MgSO₄, 9,8 g, agua destilada, c.s.p. 1000 ml

III.6.II. Análisis e Identificación de lípidos polares por HPTLC

La identificación de los lípidos polares se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (High Performance Thin-Layer Chromatography, HPTLC).

Los extractos lipídicos extraídos de las cepas objeto de estudio, se aplicaron utilizando jeringas Hamilton serie 700, de 10 µl sobre placas Merck HPTLC sílica gel 60 (Art. 5641) de máxima pureza en soporte de cristal, previamente lavadas con cloroformo/metanol (1:1, v/v) y activadas a 180 °C.

Tras la aplicación de las muestras, las placas se eluyeron en un sistema de solventes: cloroformo, ácido acético 90 %, metanol (65:30:4, v/v) (Figura 16). Una vez eluidas, las placas fueron reveladas utilizando tres métodos de tinción diferentes:

Ácido sulfúrico al 5 % en agua: tinción universal, que permite visualizar todos los lípidos tras un calentamiento suave a 160 °C.

Ácido fosfomolibdico: revelador universal, que permite visualizar todos los lípidos polares, tras un calentamiento suave a 160 °C.

Azul de molibdeno: tinción específica para fosfolípidos, revelado inmediato tras aplicación.

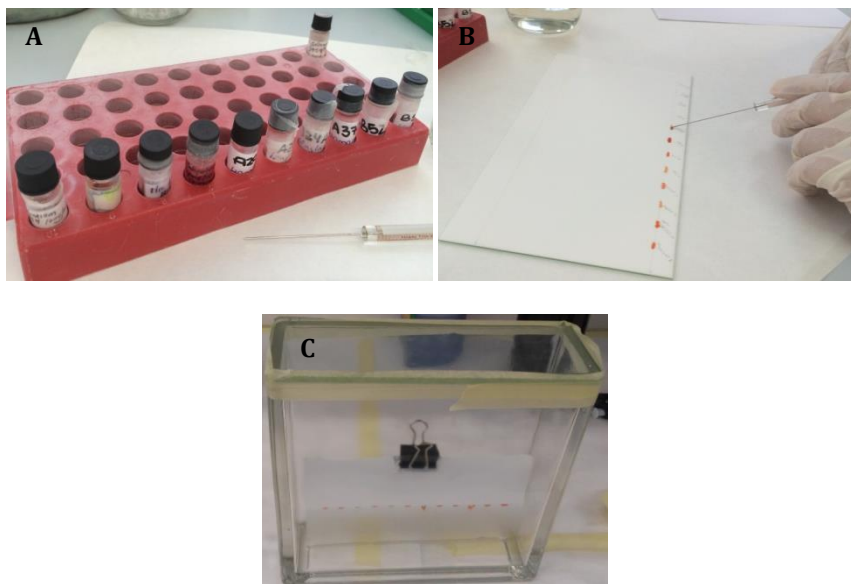


Figura 16. Cromatografía en capa fina: **A)** Extractos lipídicos obtenidos; **B)** Aplicación de la muestra en la placa de HPTLC; **C)** Desarrollo de la cromatografía.

III.7. Caracterización fenotípica

III.7.I. Características morfológicas

Para la determinación de las propiedades macroscópicas de las cepas objeto de estudio se empleó la caracterización clásica basada en la apariencia de la colonia en la placa de Petri, prestando atención al tamaño, la forma, la pigmentación, la consistencia, el tipo de borde, la superficie y la elevación de la misma.

La determinación de la morfología celular y la motilidad se llevó a cabo mediante microscopía de contraste de fases, empleando un microscopio Olympus BX41 provisto de una cámara digital DP70, a partir de cultivos líquidos en fase exponencial.

III.7.II. Características fisiológicas

Para la determinación del rango de crecimiento a distintas concentraciones de sal, pH y temperatura de cada cepa estudiada, las células se cultivaron en medio sólido a distintas concentraciones salinas (0,9, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %), pH (5,0, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 y 10,0) y temperatura (4, 15, 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50, 55 y 60 °C). En cada ensayo el resto de los parámetros se mantuvo constante. Los medios se prepararon a partir de la solución de sales al 30 % (SW30) a la cual se añadió extracto de levadura al 0,5 %. Una vez inoculadas, las placas se dejaron incubar durante 14 días durante los cuales se realizaron observaciones periódicas a distintos intervalos de tiempo (1, 3, 5, 7, 10 y 14 días).

Para la determinación del requerimiento de Mg^{2+} , el cual posee un importante valor taxonómico para las haloarqueas (Oren *et al.*, 1997), se emplearon placas con el medio base que se detalla a continuación:

Extracto de levadura	5,0 g
Glucosa	2,0 g
NaCl	195,0 g
CaCl ₂	0,83 g
KCl	5,0 g
NaHCO ₃	0,17 g
NaBr	0,58 g
KSO ₄	35,0 g
Agua destilada c.s.p	1000 ml
Agar	20,0 g

A este medio se le añadieron cantidades crecientes de $MgCl_2$ para dar lugar a las siguientes concentraciones de magnesio: 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 y 25 %. Al igual que en el caso anterior, las placas se inocularon y se dejaron incubar durante 14 días, durante los cuales se realizaron observaciones periódicas a distintos intervalos de tiempo (1, 3, 5, 7, 10 y 14 días). Se considera que el requerimiento mínimo de magnesio de un microorganismo dado es la menor concentración de magnesio a la cual es capaz de crecer dicho microorganismo.

El crecimiento en anaerobiosis se determinó en placa, en su medio óptimo en presencia de nitrato potásico al 3 %, arginina al 4 % o dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %. Los cultivos se incubaron durante 14 días a 37 °C en campanas de anaerobiosis y se utilizó AnaeroGen (Oxoid) para la generación de la atmósfera anaerobia y un indicador de anaerobiosis (Oxoid) para verificarla.

III.7.III. Características bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten, de forma experimental, determinar las características metabólicas de las cepas objeto de caracterización. Para la determinación de las características bioquímicas se empleó como medio base el medio óptimo para cada microorganismo y se le adicionó el sustrato en cuestión, cuando fue necesario.

III.7.III.I. Prueba de la oxidasa

Esta prueba permite determinar si el microorganismo en cuestión posee el complejo enzimático citocromo C oxidasa, donde el citocromo C, el primer componente en la cadena respiratoria, es capaz de cambiar el color del reactivo tetrametil-p-fenilendiamina, que es incoloro en su estado reducido y de color azul intenso en su estado oxidado (Kovacs, 1956).

Con ayuda de un palillo estéril, se extiende sobre un papel de filtro limpio, un inóculo de cultivo joven del microorganismo en cuestión, al que le añadiremos unas gotas del reactivo tetrametil-p-fenilendiamina al 1 % (Difco). La reacción se considera positiva cuando aparece un color azul intenso antes de 10 segundos (Kovacs, 1956).

III.7.III.II. Prueba de la catalasa

La prueba de la catalasa permite determinar si el microorganismo posee la enzima catalasa, la cual es capaz de descomponer el agua oxigenada en agua y oxígeno. Esta enzima está presente en la mayoría de las haloarqueas que crecen en condiciones aerobias.

La prueba se realizó añadiendo unas gotas de agua oxigenada al 3 % (v/v) sobre un cultivo joven del microorganismo estudiado. Se considera positiva si aparece un burbujeo inmediato, como consecuencia del desprendimiento de oxígeno (Cowan & Steel, 1982).

III.7.III.III. Producción de indol

Con esta prueba se pretende determinar si el microorganismo posee la enzima triptofanasa, capaz de actuar sobre el triptófano dando lugar a indol y alanina. Para ello, se utilizó el medio óptimo para el crecimiento de la cepa objeto de estudio al que se le añadió triptona al 1 % (Cowan & Steel, 1982).

El medio se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente y se incubó a 37 °C durante 14 días. Transcurrido ese tiempo, para detectar la presencia de indol, se añadieron unas gotas de reactivo de Kovacs (1928), se agitó y al cabo de un minuto, se observó el color del mismo. La prueba se consideró positiva al observar un anillo rojo en la superficie, y negativa si el anillo era de color amarillo (Cowan & Steel, 1982).

III.7.III.IV. Prueba del rojo de metilo

La prueba del rojo de metilo permite identificar si el microorganismo en cuestión utiliza la glucosa por la vía ácido-mixta, mediante la cual se produce una mezcla de ácidos fuertes que bajan el pH del medio considerablemente.

El medio de cultivo utilizado fue:

Glucosa	0,5 g
SW30	83,33 ml
Agua destilada c.s.p	100 ml

El medio se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente y se incubó a 37 °C durante 14 días. El cambio de pH se detecta añadiendo el indicador rojo de metilo; la aparición de un color rojo al añadir el indicador indica que la prueba es positiva y amarillo, negativa (Cowan & Steel, 1982).

III.7.III.V. Prueba de Voges-Proskauer

La prueba de Voges-Proskauer permite identificar si el microorganismo en cuestión utiliza la glucosa por la vía butanodiolica, mediante la que se producen pequeñas cantidades de ácidos y una gran cantidad de butanodiol, el cual al ser incoloro no es detectable en el medio. La acetoina, un compuesto intermediario de esta ruta degradativa, es capaz de

transformarse en diacetilo en presencia de oxígeno y de los reactivos α -naftol y KOH al 40 %, originando así un complejo de color rojo.

El medio utilizado y las condiciones fueron las mismas que para la prueba de rojo de metilo. Para su lectura se añadieron unas gotas de KOH al 40 % y de α -naftol después y se dejó actuar 20 minutos. La aparición de un color rojo intenso transcurrido ese tiempo indica que la prueba es positiva (Barritt, 1936).

III.7.III.VI. Reducción de los nitratos y nitritos

Esta prueba pretende investigar la capacidad de un microorganismo para utilizar los nitratos y los nitritos, los cuales pueden ser reducidos por tres vías diferentes: la asimilatoria, la desasimilatoria y la desnitrificatoria (Holding & Colle, 1971). En la primera de ellas, los nitratos son reducidos a amonio, pasando por nitrito como producto intermedio. Para ello, los microorganismos deben poseer enzimas específicas, nitrato y nitrito reductasas (Figura 17).

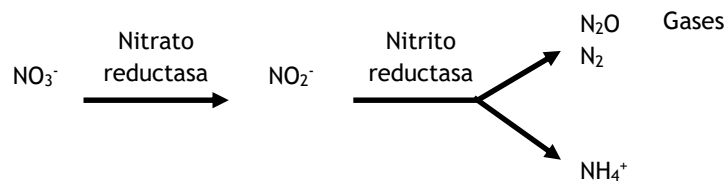


Figura 17. Esquema de la reducción de nitratos.

En la vía desasimilatoria, durante condiciones críticas o en ausencia de oxígeno, los nitratos son utilizados como aceptores finales de electrones. Por último, en la vía desnitrificatoria, las bacterias convierten los nitratos en productos gaseosos como el gas nitrógeno o el óxido nitroso, aunque también se puede acumular nitrito como compuesto intermediario (Holding & Colle, 1971).

Su determinación se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Skerman (1967). Al medio óptimo para el crecimiento de la cepa objeto de estudio se le añadió nitrato potásico al 0,2 % y una campana Durham para poder detectar la formación de gases. El medio se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente y se incubó a 37 °C durante 14 días. Transcurrido ese tiempo, se observó la presencia de gases en la campana Durham, indicativo de que los nitratos se han reducido a nitritos y éstos, a su vez, hasta gas, en cuyo caso la prueba se considera positiva. En aquellos tubos en los que no se observó la formación de gas, se añadieron unas gotas de reactivo A (solución al 0,8 % de ácido sulfanílico en ácido acético 5 N) y de reactivo B (solución al 0,5 % de α -naftilamina en

ácido acético 5 N) específicos para la detección de nitritos. La aparición de un color rojo intenso, indica que la prueba es positiva y el microorganismo posee la enzima nitrato reductasa, ya que los nitratos se han reducido hasta nitritos. Tras la ausencia de color transcurridos 5 minutos quedarían dos posibilidades, que queden los nitratos sin reducir en el medio, siendo la prueba en este caso negativa, o que todos los nitratos se han reducido a sales amónicas, las cuáles son incoloras, en cuyo caso, la prueba sería positiva. Para comprobarlo, se añadieron limaduras de zinc, un reductor fuerte que actuaría sobre los posibles nitratos del medio. La aparición de un color rojo indica que la prueba es negativa, ya que en este caso, los nitratos han sido reducidos a nitritos por la acción inducida del zinc. Por el contrario, la no aparición de color, indica que la prueba es positiva, ya que no hay nitratos en el medio que reducir, indicativo de que los nitratos se han reducido hasta su estado máximo de oxidación.

III.7.III.VII. Producción de ácido sulfhídrico

Se pretende determinar la capacidad de un microorganismo para degradar aminoácidos que contienen azufre, mediante la aparición de un color negro intenso. Para su determinación, se empleó el método de la tira impregnada de acetato de plomo (Clarke, 1953). Para ello, se cortaron tiras de papel de filtro de 1x5 cm y se impregnaron en una solución acuosa saturada de acetato de plomo, se secaron a 50-60 °C y se esterilizaron en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos (Clarke, 1953).

El medio base utilizado fue el óptimo para el crecimiento de cada cepa, al que se le añadió cisteína al 0,001 %. Una vez inoculado el medio a partir de un cultivo líquido reciente, se colocó la tira de acetato de plomo entre el tapón y el tubo, sin llegar a tocar el líquido y en condiciones de esterilidad. Se incubaron a 37 °C durante 14 días y se procedió a su lectura. La prueba se consideró positiva tras la aparición de un color negro intenso en la tira, resultado de la reacción entre el ácido sulfhídrico liberado y el acetato de plomo.

III.7.III.VIII. Citrato de Simmons

Se investiga la capacidad de un microorganismo para utilizar el citrato sódico como única fuente de carbono y energía. Para su determinación, se siguió la técnica de Koser (1923): al medio óptimo de crecimiento para cada cepa, se añadió citrato sódico al 0,2 % y azul de bromotimol al 0,008 %. Una vez autoclavado, se distribuyó en tubos previamente esterilizados, dejándolos solidificar en pico de flauta. Los tubos se inocularon a partir de un cultivo sólido y se incubaron a 37 °C durante 14 días, al cabo de los cuales se procedió a la lectura. La prueba se considera positiva si se produce un viraje del medio a color azul

intenso como resultado de la alcalinización del medio por la formación de carbonatos y bicarbonatos tras el metabolismo progresivo del citrato, y siendo negativa si permanece verde (Harrigan & McCance, 1979).

III.7.III.IX. Prueba de la ureasa

La prueba de la ureasa permite determinar si el microorganismo posee la enzima ureasa, la cual es capaz de hidrolizar la urea del medio dando lugar a amoníaco y dióxido de carbono, que se unen para formar carbonato amónico, produciendo una alcalinización del medio.

Para su determinación se utilizó el medio agar urea descrito por Christensen (1946) al 25 % de sales, al que una vez autoclavado, se le añadió una solución de urea al 2 % esterilizada por filtración. Se distribuyó en tubos estériles y se dejó solidificar en pico de flauta. Los tubos se inocularon a partir de un cultivo joven y se incubaron a 37 °C durante 14 días. La prueba se consideró positiva tras la aparición de un color rosa intenso, y negativa, si el cultivo permanece de color amarillo.

III.7.III.X. Prueba de las descarboxilasas

Esta prueba pretende determinar si el microorganismo problema posee las enzimas arginina, lisina y ornitina descarboxilasas, las cuales descomponen estos aminoácidos, con la consecuente liberación de aminas por descarboxilación (Koneman *et al.*, 1983).

El medio utilizado fue el óptimo para el crecimiento de cada microorganismo al que se le añadió rojo fenol al 0,01 % como indicador y los aminoácidos (arginina, lisina u ornitina) al 1 % esterilizados por filtración, una vez autoclavado el medio. El medio se distribuyó en tubos en agar vertical, que se sembraron en picadura con hilo de platino y se cubrieron con una capa de aceite de parafina estéril de 1 cm de espesor. La incubación se realizó a 37 °C durante 14 días; transcurrido ese tiempo, la presencia de un color rojo en los tubos indica una reacción positiva (Koneman *et al.*, 1983).

III.7.III.XI. Producción de ácidos a partir de carbohidratos

Para la determinación de la capacidad de un microorganismo para producir ácidos a partir de un determinado carbohidrato se siguió la metodología descrita por Koser (1923).

La composición exacta del medio base utilizado fue:

Extracto de levadura	5,0 g
Rojo fenol	0,01 g
SW30	833,3 ml
Agua destilada c.s.p	1000 ml

El pH se ajustó aproximadamente a 7,5 para obtener una coloración roja adecuada, que permitiera observar el viraje del color producido por el indicador. Una vez autoclavado, se añadieron los siguientes carbohidratos esterilizados por filtración, a una concentración final del 1 %: D-amigdalina, D-arabinosa, arbutina, L-citrulina, dulcitol, D-etionina, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, inulina, lactosa, maltosa, D-manitol, D melezitosa, D-rafinosa, sacarosa, sorbitol, D-trehalosa, L-xilitol y D-xilosa.

El medio se inoculó a partir de un cultivo líquido reciente y se incubó a 37 °C durante 14 días. La prueba se consideró positiva tras el viraje de color a amarillo, resultado de la acidificación como consecuencia de la producción de ácidos en el medio.

III.7.III.XII. Hidrólisis del almidón, gelatina, ADN, esculina y Tween 80

Con estas pruebas realizadas en medio sólido se pretende determinar si el microorganismo problema posee una serie de enzimas hidrolíticas (Tabla 7).

El medio utilizado en todos los casos fue el óptimo para cada microorganismo, al que se le añadieron los diferentes sustratos (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen de las diferentes actividades hidrolíticas.

Hidrólisis	Enzima	Sustrato	Reactivo	Resultado
Almidón	Amilasa	Almidón soluble (1 %)	Lugol	La detección del almidón se realiza añadiendo un compuesto yodado (lugol), el cual reacciona con el almidón formando un complejo morado. Un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento del microorganismo indica que la prueba es positiva (Cowan & Steel, 1982).
Gelatina	Gelatinasa	Gelatina (1 %)	Reactivo de Frazier	La detección de la gelatina se realiza añadiendo el reactivo de Frazier (solución ácida de cloruro de mercurio), el cual reacciona con la gelatina dando lugar a un complejo blanquecino. Un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento del microorganismo, indica que la prueba es positiva (Frazier, 1926).

Hidrólisis	Enzima	Sustrato	Reactivo	Resultado
ADN	ADNasa	ADN (0,2 %)	HCl 1 N	La detección de la gelatina se realiza añadiendo HCl 1 N. En estas condiciones, el ADN precipita dando lugar a una coloración blanquecina. Un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento del microorganismo, indica que la prueba es positiva (Jeffries <i>et al.</i> , 1957).
Esculina	Esculinasa	Esculina (0,1%) y citrato férrico (0,5%)	--	La lectura se considera positiva cuando aparece un halo marrón-negro alrededor de la zona de crecimiento del microorganismo, debido a que en la hidrólisis de la esculina se produce esculetina, la cual, con el Fe ³⁺ presente en el medio, forma un complejo férrico de color negro (Koneman <i>et al.</i> , 1983).
Tween 80	Lipasa	CaCl ₂ (0,5 %) y Tween 80 (1 %)* *Debe estar estéril y se añade una vez autoclavado el medio	--	La lectura se considera positiva si aparece un precipitado blanco alrededor de la zona de crecimiento del microorganismo, como consecuencia de la reacción entre el CaCl ₂ y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis del Tween 80.

Las condiciones de cultivo fueron las mismas en todos los casos, se sembraron cuatro microorganismos por placa, haciendo una pequeña extensión y se incubaron a 37 °C durante 14 días.

III.7.IV. Pruebas nutricionales

III.7.IV.I. Utilización de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos como única fuente de carbono y energía

Se pretende determinar la capacidad de un microorganismo para utilizar una serie de sustratos (carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos) como única fuente de carbono y energía (Stanier *et al.*, 1966). A continuación se detalla la composición del medio base utilizado:

Extracto de levadura	0,01 g
NH ₄ Cl	2,0 g
SW30	833,3 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

El pH y la salinidad se ajustaron al óptimo de crecimiento del microorganismo en cuestión. Los sustratos se añadieron tras su esterilización por filtración, una vez autoclavado el medio a una concentración final de 0,2 % para carbohidratos y alcoholes, y al 0,1 % para los ácidos orgánicos. Los compuestos ensayados se muestran en la Tabla 8.

Los medios se inocularon a partir de un cultivo líquido reciente y se incubaron a 37 °C, realizándose lecturas periódicas. En todos los casos, la lectura se realizó utilizando un control negativo, preparado con medio base sin sustrato e inoculado. La prueba se consideró positiva si el crecimiento fue mayor que en el control y negativa en el caso contrario.

III.7.IV.II. Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono, nitrógeno y energía

La técnica y metodología que se utilizó fue la misma que en la prueba anterior. El medio base utilizado presenta la siguiente composición:

Extracto de levadura	0,01 g
SW30	833,3 ml
Agua destilada c.s.p	1000 ml

El pH y la salinidad se ajustaron al óptimo de crecimiento del microorganismo. Los sustratos fueron añadidos tras su esterilización por filtración, una vez autoclavado el medio, a una concentración final de 0,1 % (Tabla 8).

Tabla 8. Carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos estudiados para determinar su utilización como única fuente de carbono y energía. Aminoácidos y derivados estudiados para determinar su utilización como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Carbohidratos	Almidón, D-arabinosa, D-celobiosa, esculina, fructosa, D-fucosa, D-galactosa, D-glucosa, lactosa, maltosa, D-manosa, D-melezitosa, D-melibiosa, L-rafinosa, D-rafinosa, D-ribosa, sacarosa, salicina, D-trehalosa y D-xilosa.
Alcoholes	Butanol, dulcitol, etanol, glicerol, myo-inositol, D-manitol, metanol, propanol, D-sorbitol y xilitol.
Ácidos orgánicos	Acetato, benzoato, citrato, formato, fumarato, hipurato, D,L-malato, propionato, succinato, tartrato, valerato y L-glutamato
Aminoácidos	L-alanina, L-arginina, aspártico, L-asparagina, L-cisteína, fenilalanina, L-glicina, glutamina, L-isoleucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-serina, L-treonina, triptófano y valina.

III.8. Estudios genómicos

III.8.I. Secuenciación del ADN genómico

El ADN genómico de las cepas seleccionadas en este trabajo se obtuvo siguiendo la metodología previamente descrita en el apartado III.5.I. (Extracción, purificación y determinación de la concentración y pureza del ADN).

La secuenciación de los genomas fue llevada a cabo por la empresa STABVida (Oeiras, Portugal) mediante el uso de la plataforma de secuenciación Illumina Hiseq 4000, generando lecturas de tipo *paired end* de 150 pb.

III.8.II. Análisis bioinformático

Una vez secuenciados los genomas, para el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se utilizaron diversos programas bioinformáticos alojados en un servidor virtual disponible en la Universidad de Sevilla y en el servidor virtual del Departamento de Hidrobiología de la Academia Checa de Ciencias en České Budějovice (República Checa), durante la estancia realizada por la doctoranda en dicho laboratorio. Para el acceso a ambos servidores se utilizó el intérprete SSH (*Secure Shell*). La plataforma virtual NX Client 3.5.0.0. fue también utilizada ocasionalmente para el acceso al servidor de la Universidad de Sevilla.

III.8.II.1. Control de calidad y ensamblaje

Para el filtrado previo y la eliminación de las secuencias de baja calidad se utilizaron los programas FastQC versión 0.10.1 (Andrews, 2010) y una combinación de herramientas informáticas implementadas dentro del proyecto BMap (Bushnell, 2016), donde el script `bbduk.sh` permitió: a) eliminar las secuencias de baja calidad a partir del archivo con los *reads* interlineados (`qtrim = rl trimq = 18`), b) renombrar los *reads*, c) identificar y eliminar los controles phiX y p-Fosil2 y d) eliminar los adaptadores de Illumina. Posteriormente el script `bbmerge.sh` se utilizó para la identificación *de novo* de cualquier otro adaptador que pudiera estar presente.

Una vez depuradas las secuencias genómicas, éstas fueron ensambladas. El proceso de ensamblaje consiste en el solapamiento de las secuencias cortas generadas tras la secuenciación (*reads*), para dar lugar a secuencias más largas (*contigs*). Existen diferentes estrategias de ensamblaje. Una de ellas se basa en grafos De Bruijn (DBG), y permite el ensamblaje eficiente de secuencias cortas (Compeau *et al.*, 2011; Nagarajan & Pop, 2013; Vollmers *et al.*, 2017). Esta estrategia divide los *reads* en segmentos cortos solapantes de longitud fija (*k-mers*) que se organizan en un gráfico De Bruijn, en el cual hay un nodo por cada uno de estos *k-mers* y un conector por cada solapamiento entre los mismos, los cuales indican que *k-mers* adyacentes se solapan por “*k-1* letras”. En este método por tanto, la longitud del *k-mer* se relaciona con la del solapamiento que el ensamblador es capaz de detectar (Nagarajan & Pop, 2013). En concreto, los genomas secuenciados en este trabajo se ensamblaron *de novo* utilizando el ensamblador Spades v.3.9.1 o v.3.12.0

(Bankevich *et al.*, 2012), en función de la versión instalada en un servidor u otro, que utiliza este tipo de estrategia.

El proceso de ensamblaje presenta algunas limitaciones debido al método de secuenciación elegido, a la frecuencia y longitud de las regiones repetitivas o a la generación de una cobertura de secuenciación no uniforme por razones arbitrarias (Miller *et al.*, 2010), por lo que se debe evaluar la calidad del ensamblaje. Por norma general, un buen resultado sería aquel que maximiza la precisión (menor número de errores de ensamblaje e indeterminaciones) y el tamaño final del ensamblado (resultando en un menor número de *contigs* y de la mayor longitud posible) (Miller *et al.*, 2010; van der Walt *et al.*, 2017). Los parámetros más utilizados para evaluar estas propiedades son el N50 (definido como el tamaño de *contig* tal que considerando todos los de igual o mayor tamaño se recupera la mitad de las bases del ensamblaje), el porcentaje de lecturas o bases incluidas en los *contigs* obtenidos, cantidad de errores de ensamblaje y número o densidad de los marcos abiertos de lectura (ORFs) en los *contigs* obtenidos como resultado (Miller *et al.*, 2010; Nagarajan & Pop, 2013; Olson *et al.*, 2017). En este trabajo la calidad del ensamblaje en base a estos parámetros se evaluó empleando QUAST v.2.3 (Gurevich *et al.*, 2013).

Finalmente, para determinar el porcentaje del genoma ensamblado, así como su nivel de contaminación y heterogeneidad, se utilizó el programa CheckM v.1.0.5, que estima dicho porcentaje en base a la presencia de genes conservados en el grupo filogenómico al que puede ser asignado el genoma con mayor exactitud, y el grado de contaminación mediante la determinación del número de copias de estos genes que se encuentran y su grado de similitud, calculado mediante identidad aminoacídica media (AAI) (Parks *et al.*, 2015).

III.8.II.II. Anotación de secuencias genómicas

La anotación es el proceso computacional mediante el cual se asigna la información biológica a una secuencia genómica (Cuccuru *et al.*, 2014; Ekblom & Wolf, 2014), mediante su comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos. El proceso de anotación genómica incluye la detección de los genes, su estructura y organización, así como la asignación de la probable función que ejercen. El éxito de la anotación depende en gran parte de la calidad del ensamblaje, ya que, solo genomas prácticamente completos darán resultados satisfactorios.

Las anotaciones pueden realizarse de forma automática o manual. La anotación automática es un proceso rápido que procesa los datos de forma consistente y no necesita de grandes equipos de anotadores. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, sus resultados son más generales, menos exactos y más propensos a errores, pudiendo predecir menos genes de los que realmente existen (Tripp *et al.*, 2015). Por esta razón, para conseguir anotaciones automáticas fiables, éstas deberían ser revisadas manualmente.

Durante este estudio, los genomas han sido anotados de forma automática utilizando, en el caso de los genomas de las cepas objeto de estudio F13-25^T y F16-60^T, las herramientas RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) (Aziz *et al.*, 2008) y PGAAP (*Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline*) (Tatusova *et al.*, 2016), desarrollada por NCBI. En el caso de los genomas de las demás cepas estudiadas se utilizó Prokka para su anotación automática (Seemann, 2014).

RAST identifica los marcos abiertos de lectura y los anota basándose en los subsistemas SEED (Overbeek *et al.*, 2005) para reconstruir redes metabólicas. Permite además, la corrección manual de estas anotaciones (Edwards & Holt, 2013; Brettin *et al.*, 2015).

PGAAP combina el modelo oculto de Markov (HMM, hidden Markov model) con varios algoritmos para la predicción de genes, entre los que se encuentran GeneMark (Lukashin & Borodovsky, 1998) y Glimmer (Salzberg *et al.*, 1998). Aquellos genes que tras esta primera aproximación no hayan sido anotados correctamente, son buscados en bases de datos de proteínas en formato *clusters*, entre las que se encuentran los *clusters* de Grupos Ortólogos (base de datos COG) (Tatusov *et al.*, 2001) y la base de datos de *clusters* de organismos procariotas de NCBI (Klimke *et al.*, 2009).

Prokka identifica los genes y describe su función, comparándolos con una gran base de datos de secuencias conocidas. Una vez identificados los genes presentes en estos genomas, se les asignó un número K que permitiera identificarlos para lo que se utilizó BlastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016). Por último para la visualización y reconstrucción de las rutas metabólicas en base a esos número K, se utilizó KEGG pathways y KEGG modules. Todos estos resultados pueden ser visualizados y comparados con los de otros genomas en la misma plataforma.

Adicionalmente, dado que la anotación manual genera datos más fiables y de mayor calidad, las proteínas de interés seleccionadas se revisaron manualmente utilizando jackhmmer (Finn *et al.*, 2015), CDD (Marchler-Bauer *et al.*, 2015) y Phobius (Kall *et al.*, 2007).

III.8.III. Análisis genómico comparativo

III.8.III.I. Estimación de la posición filogenómica

Con el propósito de identificar la posición filogenómica exacta de los microorganismos aislados en esta Tesis Doctoral y su relación con otros microorganismos ya descritos, se llevó a cabo la construcción del árbol filogenómico para cada uno de los grupos aislados en base al conjunto de genes correspondientes al core-genoma.

El core-genoma se define como el conjunto de genes compartidos por el grupo de genomas objeto de estudio; el variable-genoma, constituido por los genes presentes en dos o más genomas; y el conjunto de genes únicos, que son aquellos específicos de cada genoma en particular. En conjunto, el core-genoma, el variable-genoma y los genes únicos de cada cepa constituyen el pangenoma, siendo así éste el conjunto de todos los genes de todas las cepas de un grupo de microorganismos.

La matriz del core-genoma de *Halorientalis pallida*, *Haloglomus irregulare* y *Natronomonas salsguinis*, se obtuvo utilizando la herramienta enveomics (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2016). Para el alineamiento y posterior concatenación de dichos genes se utilizó el programa MUSCLE v.3.8.31. (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004) con optimización diagonal y un valor máximo de interacciones de 1, seguidamente, se construyó el árbol filogenómico utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.0 (Tamura et al., 2013), con el algoritmo neighbour-joining y la corrección Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969).

De acuerdo al *modus operandi* de trabajo del grupo del Dr. Ghai, en el Departamento de Hidrobiología de la Academia Checa de Ciencias en České Budějovice (República Checa), donde se analizaron los genomas de los géneros *Halonotius* y *Halosegnis*, se utilizaron otros programas para este mismo fin. En estos casos, el conjunto de proteínas conservadas se obtuvo en base a anotaciones con la base de datos COG (Tatusov et al., 2001). Posteriormente, estas secuencias se alinearon utilizando el software Kalign (empleando para ello los parámetros por defecto) (Lassmann & Sonnhammer, 2005), se filtraron con la ayuda de trimAl (Capella-Gutierrez et al., 2009) y por último se concatenaron. Con el alineamiento obtenido, se construyeron los árboles filogenómicos utilizando el programa FastTree2 (Price et al., 2010), en base al modelo JTT + CAT, aproximación Gamma y 100 replicaciones de *bootstrap*. En el caso concreto de *Halonotius* esta metodología no dio tan buenos resultados, y en su lugar se emplearon PRANK v.150803 (Löytynoja, 2014) (-protein +F) y BMGE (Block Mapping and Gathering

with Entropy) (Criscuolo & Gribaldo, 2010) (-m BLOSUM30 -t AA -g 0,5), para el alineamiento y filtración de las secuencias, respectivamente. Asimismo, el árbol filogenético en este caso se construyó con ayuda del programa IQ-TREE v.1.6.7 (Nguyen et al., 2015), con una matriz de tipo LG (Le & Gascuel, 2008), frecuencia de bases empírica y Gamma heterogeneidad. La tipología del árbol se comprobó utilizando SH-AIrt y UFBoot.

III.8.III.II. Estimación de la semejanza genómica entre microorganismos

Hoy en día, la genómica ha revolucionado el mundo de la taxonomía bacteriana, donde la hibridación *in silico* y el cálculo de los parámetros de ANI (*Average Nucleotide Identity*) y AAI (*Average Amino Acid Identity*) han sustituido por completo a la técnica tradicional de hibridación ADN-ADN (DDH) para la delineación de especie procariota. Con la finalidad de determinar si los microorganismos aislados en este trabajo constituían nuevos taxones, se realizó el cálculo de todos estos valores.

La hibridación *in silico* es una herramienta altamente fiable que calcula las distancias filogenéticas entre genomas con resultados más fidedignos que los obtenidos tradicionalmente de forma experimental. El valor límite establecido del 70 % para la delineación de especies procariotas según la técnica de hibridación ADN-ADN (Stackebrandt et al., 2002) se mantiene y se sigue tomando como referencia para la hibridación *in silico*. Resultados iguales o superiores a este valor indica que se trata de cepas pertenecientes a la misma especie. En este trabajo los porcentajes de hibridación *in silico* se obtuvieron por medio de la herramienta online GGDC v.2.1. (*Genome-to-Genome Distance Calculator*) (Meier-Kolthoff et al., 2013), utilizando como referencia la fórmula 2 (Auch et al., 2010b).

Por otro lado, el cálculo de los índices de ANI (*Average Nucleotide Identity*) y AAI (*Average Amino Acid Identity*), los cuales representan el promedio de identidad de secuencia de nucleótidos o de aminoácidos respectivamente, que muestran todos los genes ortólogos compartidos, constituyen hoy también parámetros muy robustos para la taxonomía de procariotas. En el caso del ANI (*Average Nucleotide Identity*) el valor que se toma como referencia para delimitar especies es del 95 % (Konstantinidis & Tiedje, 2005a; Klappenbach et al., 2007; Richter & Rosselló-Móra, 2009; Konstantinidis et al., 2017).

Debido a las diferencias evolutivas entre secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, los valores de AAI (*Average Amino Acid Identity*) presenta un nivel de resolución diferente al ANI (*Average Nucleotide Identity*), siendo el AAI (*Average Amino Acid Identity*), útil para microorganismos más distantes filogenéticamente (Konstantinidis & Tiedje, 2005b;

Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014). Aunque no existe un criterio tan definido como en el caso de las especies, por norma general, se puede considerar que dos organismos pertenecen a géneros diferentes cuando sus valores de AAI (*Average Amino Acid Identity*) son inferiores al 60-65 % (Rodríguez-R y Konstantinidis, 2014; Konstantinidis et al., 2017).

Para el cálculo de los porcentajes de ANI se utilizó el software OAT v.0.93.1 (Lee et al., 2016), mientras que para el cálculo de los valores de AAI se empleó la herramienta online AAI calculator (Rodríguez-R & Konstantinidis, 2014).

III.8.III.III. Representaciones genómicas

Para poder visualizar con mayor detenimiento las características de algunos de los genomas, se llevaron a cabo representaciones circulares de los mismos empleando la herramienta de libre acceso R v.3.6.1. y el paquete específico Circlize v.0.4.6. (Gu et al., 2014).

En el caso de *clusters* de interés, también se obtuvieron representaciones lineares utilizando, en este caso, la herramienta de libre acceso R v.3.6.1. y concretamente el paquete específico GenoPlotR versión 0.8.9. (Guy et al., 2010).

III.8.III.IV. Sintenia

La sintenia determina que los organismos relacionados no sólo tienen una elevada homología de las secuencias de los genes individuales, sino que además, la organización espacial de dichos genes sea similar, es decir, conservan el mismo orden a excepción de pequeñas diferencias (Blom et al., 2009).

Para llevar a cabo el estudio de la sintenia en los genomas de las cepas del género *Halosegnis* se utilizó el programa Easyfig versión 2.2.3 (Sullivan et al., 2011).

III.8.III.V. Determinación del punto isoeléctrico y la frecuencia de aminoácidos

El cálculo del proteoma predicho para las secuencias de los distintos genomas analizados en este trabajo se calculó utilizando el programa iep (*isoelectric point*), implementado en el paquete EMBOSS (Rice et al., 2000), a partir del archivo del genoma con las secuencias traducidas a aminoácidos obtenidas mediante Prodigal (Hyatt et al., 2010).

Para el cálculo de la frecuencia de uso de aminoácidos, también se partió del archivo del genoma con las secuencias traducidas a aminoácidos; éstos fueron analizados mediante

el lenguaje de programación Perl, para descartar las secuencias menores de 100 aminoácidos y calcular el porcentaje de uso de cada aminoácido.

III.8.III.VI. Determinación de la presencia de secuencias víricas y sistemas CRISPR/Cas

Para llevar a cabo la búsqueda de posibles secuencias víricas en los genomas de interés, se empleó la herramienta virtual PHASTER (Arndt *et al.*, 2016), mientras que para la determinación de la presencia de sistemas CRISPR/Cas, se utilizó CRISPRCasFinder (Couvin *et al.*, 2018).

III.8.III.VII. Análisis de rodopsinas

Para el análisis de las rodopsinas presentes en los genomas estudiados se llevó a cabo una búsqueda de estas secuencias en los mismos, utilizando para ello la herramienta hmmsearch (Eddy, 2011) y el modelo oculto de Markov (HMM, hidden Markov model) de la familia de proteínas de bacteriorodopsinas (Pfam: PF01036).

Una vez identificadas las secuencias, éstas fueron alineadas utilizando como referencia una base de datos compuesta de una colección de rodopsinas tipo-1, mediante el *software* MAFFT v7.055b y el método L-INS-i (Katoh & Standley, 2013).

Por último, para la construcción del árbol basado en estas secuencias se empleó la herramienta FastTree2 v2.1.7. (Price *et al.*, 2010).

III.8.IV. Ecología ambiental

III.8.IV.I. Abundancia de secuencias metagenómicas

Con el objetivo de calcular la abundancia y la distribución de las especies y géneros estudiados en esta Tesis Doctoral en diferentes ambientes hipersalinos a distintas salinidades, se calculó el porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas con los mismos en diferentes bases de datos metagenómicas. Los metagenomas utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 9.

Una vez descargados los metagenomas de las bases de datos públicas, se utilizó el programa UBLAST (Edgar, 2010) para enfrentarlos a la base de datos de SILVA SSURef_Nr99_132 (Pruesse *et al.*, 2007), cuyas secuencias se agruparon al 85 % de identidad empleando UCLUST (Edgar, 2010). A continuación, se eliminaron las secuencias de ARNr 16S con un *e-value* menor a $1e^{-5}$, utilizando para ello SSU-ALIGN (Nawrocki, 2009).

Las secuencias *bona fide* de ARNr 16S resultantes, se enfrentaron a la base de datos de SILVA SSURef_NR99_132 (Pruesse *et al.*, 2007) mediante BLASTN (e-value < 1e-5). Solo se consideraron aquellas secuencias con identidad superior o igual al 80 % y con una longitud mínima de 90 pb.

III.8.IV.II. Reclutamientos metagenómicos

Para calcular la abundancia concreta de cada cepa estudiada en un ambiente natural concreto se realizaron reclutamientos de secuencias metagenómicas relacionadas con los distintos genomas estudiados en este trabajo frente a los mismos metagenomas detallados en la Tabla 9.

En primer lugar, para evitar resultados sesgados, los *contigs* de cada uno de los genomas se concatenaron en uno solo y se enmascaró la secuencia de los genes ARN ribosómicos. En segundo lugar, se llevaron a cabo búsquedas mediante el programa BLASTN, empleando como base de datos el genoma del microorganismo cuya abundancia se quiere determinar y como *query* los metagenomas de dicho ambiente. Se consideraron *hits* aquellas secuencias con una longitud superior o igual a 30 nucleótidos, con identidad mayor del 95 % y con un e-value <= 1e-5. La representación gráfica de estos resultados se llevó a cabo a través de un programa en Perl.

Tabla 9. Bases de datos metagenómicas empleadas en este trabajo. ND, no determinado.

Metagenoma	Hábitat	Localización	Salinidad	Número de acceso	Referencia
G	Lago	Irán	5 % NaCl	ERS1455389	Naghoni <i>et al.</i> , (2017)
ChVmed	Salina	Estados Unidos	12 % NaCl	4440425.3	Rodríguez-Brito <i>et al.</i> , (2010)
SS13	Salina	Alicante	13 % NaCl	SRX328504	Fernández <i>et al.</i> , (2014a)
R	Lago	Irán	18 % NaCl	ERS1455390	Naghoni <i>et al.</i> , (2017)
Kebrit DUI	Cuenca hipersalina	Mar Rojo	18,2 % NaCl	3300006156	Ngugi <i>et al.</i> , (2016)
Kebrit DLI	Cuenca hipersalina	Mar Rojo	18,2 % NaCl	3300006157	Ngugi <i>et al.</i> , (2016)
SS19	Salina	Alicante	19 % NaCl	SRX090228	Ghai <i>et al.</i> , (2011)
IC21	Salina	Huelva	21 % NaCl	SRX352042	Fernández <i>et al.</i> , (2014b)
ChVhigh1	Salina	Estados Unidos	27 % NaCl	4440430.3	Rodríguez-Brito <i>et al.</i> , (2010)
ChVhigh2	Salina	Estados Unidos	27 % NaCl	4440429.3	Rodríguez-Brito <i>et al.</i> , (2010)
ChVhigh3	Salina	Estados Unidos	27 % NaCl	4440438.3	Rodríguez-Brito <i>et al.</i> , (2010)
Tyrrell 0.1	Lago	Australia	29 % NaCl	SRR5637210	Podell <i>et al.</i> , (2014)
Tyrrell 0.8	Lago	Australia	29 % NaCl	SRR5637211	Podell <i>et al.</i> , (2014)
S7	Lago	Rumania	30 % NaCl	SRR8921445	Unpublished
W	Lago	Irán	30 % NaCl	ERS1455391	Naghoni <i>et al.</i> , (2017)
SS33	Salina	Alicante	33 % NaCl	SRX347883	Fernández <i>et al.</i> , (2014a)
SS37	Salina	Alicante	37 % NaCl	SRX090229	Ghai <i>et al.</i> , (2011)

Metagenoma	Hábitat	Localización	Salinidad	Número de acceso	Referencia
Cáhuill	Laguna	Chile	34 % NaCl	SRX680116	Plominsky <i>et al.</i> , (2014)
Gujarat	Suelo	India	ND	ERP005612	Patel <i>et al.</i> , (2015)
SMO1	Suelo	Huelva	24.0 dS / m	SRR5753725	Vera-Gargallo <i>et al.</i> , (2018)
SMO2	Suelo	Huelva (España)	54.4 dS / m	SRR5753724	Vera-Gargallo <i>et al.</i> , (2018)

III.8.IV.III. Identificación de enzimas de interés en las bases de datos metagenómicas

En el caso concreto del análisis genómico del género *Halonotius*, fue necesario probar la existencia de enzimas dependientes de vitamina B₁₂ en las bases de datos metagenómicas donde este género resultó abundante.

Para el ensamblaje de las secuencias de las bases de datos metagenómicas se utilizó el software MEGAHIT v.1.1.5 (Li *et al.*, 2015), con los siguientes tamaños de *k-mer*: 49, 69, 89, 109, 129 y 149 y el resto de parámetros por defecto. Los genes codificantes de proteínas fueron predichos con MetaProdigal v2.6.2 (Hyatt *et al.*, 2012) y para llevar a cabo la identificación de las enzimas dependientes de vitamina B₁₂ en estas bases de datos ya ensambladas, se utilizó la herramienta hmmsearch (-E -evaluate 1e-5 -prcov 50 -hmcov 50) (Eddy, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



IV.1. Aislamiento de nuevas cepas de haloarqueas y bacterias halófilas

En la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio de la microbiota presente en las salinas de Isla Cristina y de Isla Bacuta, localizadas en la provincia de Huelva, y en un suelo salino localizado en el Paraje Natural Marismas del Odiel, también ubicado en la misma provincia. Estudios metagenómicos recientes llevados a cabo en estos ambientes hipersalinos han puesto de manifiesto que un elevado número de microorganismos, que representan una amplia proporción de la población de dichos hábitats, aún no han sido aislados ni caracterizados hasta la fecha, siendo éste el principal objetivo de esta Tesis Doctoral.

Con el objetivo de identificar algunos de estos microorganismos y aislarlos en cultivo puro, se llevaron a cabo varios muestreos durante los años 2014 y 2016, durante los cuales se tomaron 29 muestras de agua y seis muestras de suelos salinos y para los que se diseñaron nuevos medios y condiciones de cultivo tal y como se describe en el apartado III.2. de Material y Métodos.

Siguiendo la metodología descrita en el apartado III.3. de Material y Métodos, las placas inoculadas a partir de ambos tipos de muestras de forma directa y a partir de diluciones de las mismas, se incubaron durante un período superior a dos o tres meses, a lo largo del cual se fueron observando los distintos tipos de colonias y marcando aquellas de crecimiento más rápido y primera aparición. Tras dicho período y durante varios meses de estudio, se seleccionaron aquellas colonias de crecimiento más tardío, que no habían sido marcadas previamente y que además pudieran pasar desapercibidas a simple vista debido a su menor tamaño y/o apenas pigmentación. Tras sucesivas resiembras hasta conseguir obtenerlas en cultivo puro, en total se consiguieron aislar más de 2000 cepas, las cuáles se seleccionaron para su secuenciación parcial del gen ARNr 16S y determinar así su posición filogenética (ver apartado III.5. de Material y Métodos). De entre todos los aislados se ha conseguido identificar un total de 254 cepas, de las cuales 209 corresponden a cepas de haloarqueas y 45 a bacterias halófilas. Algunos de los otros aislados no consiguieron ser subcultivados posteriormente, imposibilitando así su identificación; otros tantos no pudieron ser determinados a pesar de los numerosos intentos realizados, mientras que los restantes se conservan en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla), y continúan pendientes de identificación.

En la Tabla 10 se recogen el número total de cepas identificadas a partir de cada uno de los puntos de muestreo, siendo en los tres casos, el número de cepas de haloarqueas identificadas superior al de bacterias. Además, la Figura 18 representa la asignación taxonómica de cada uno de esos aislados a nivel de género.

Tabla 10. Cepas aisladas (haloarqueas y bacterias halófilas) a partir de los ambientes estudiados.

Punto de muestreo	Tipo	Cepas aisladas	
		Haloarqueas	Bacterias halófilas
Isla Cristina	Salina	142	20
Isla Bacuta	Salina	46	12
Marismas del Odiel	Suelo hipersalino	74	-

Por otro lado, en la Tabla 11 se muestra el número total de cepas aisladas asociadas a cada género microbiano entre el total de ambientes hipersalinos muestreados.

Tabla 11. Número de cepas aisladas (haloarqueas y bacterias halófilas) ordenadas a nivel de género.

Género	Dominio	Nº Cepas	%
<i>Halorubrum</i>	Archaea	127	43,5
<i>Haloarcula</i>	Archaea	47	16,1
<i>Natronomonas</i>	Archaea	42	14,4
<i>Halonotius</i>	Archaea	8	2,7
<i>Halomicroarcula</i>	Archaea	7	2,4
<i>Halobellus</i>	Archaea	6	2,1
<i>Haloplanus</i>	Archaea	5	1,7
<i>Halogramum</i>	Archaea	5	1,7
<i>Halorientalis</i>	Archaea	2	0,7
<i>Halomicrobium</i>	Archaea	2	0,7
<i>Halovenus</i>	Archaea	2	0,7
<i>Halosimplex</i>	Archaea	2	0,7
<i>Halapricum</i>	Archaea	2	0,7
<i>Halogeometricum</i>	Archaea	1	0,3
<i>Haladaptatus</i>	Archaea	1	0,3
<i>Halobacterium</i>	Archaea	1	0,3
<i>Pseudomonas</i>	Bacteria	10	3,4
<i>Salinibacter</i>	Bacteria	7	2,4
<i>Salicola</i>	Bacteria	4	1,4
<i>Halomonas</i>	Bacteria	4	1,4
<i>Marinobacter</i>	Bacteria	2	0,7
<i>Halovibrio</i>	Bacteria	2	0,7
<i>Rhodovibrio</i>	Bacteria	2	0,7
<i>Tamlnaduibacter</i>	Bacteria	1	0,3

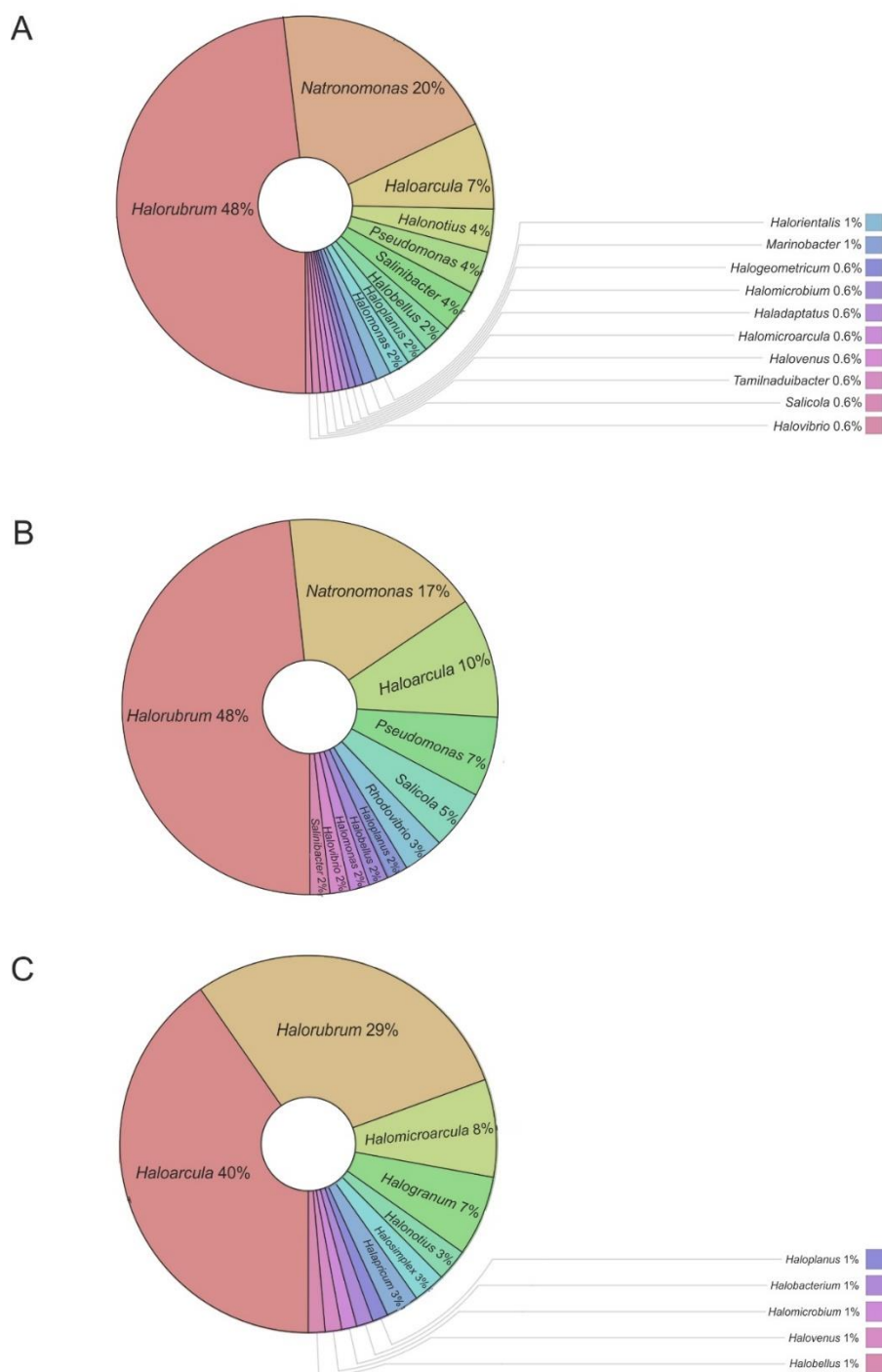


Figura 18. Porcentaje global de las cepas aisladas agrupadas por géneros que se han obtenido de cada uno de los ambientes estudiados. A) Salinas de Isla Cristina, B) Salinas de Isla Bacuta, C) Suelo hipersalino de las Marismas del Odiel.

Tal y como se puede observar en la Tabla 11, se han conseguido identificar un total de 254 cepas relacionadas con 24 géneros microbianos diferentes, entre los que se incluyen un total de 16 géneros pertenecientes al dominio *Archaea* y 8 al dominio *Bacteria*. La Figura 18 por su parte, muestra que la mayor proporción de cepas identificadas se corresponden con haloarqueas, relacionadas filogenéticamente en su mayoría con los géneros *Halorubrum*, *Natronomonas* y *Haloarcula* en el caso de las salinas de Isla Cristina, mientras que en lo referente a las bacterias halófilas, son *Pseudomonas* y *Salinibacter* los grupos más frecuentemente aislados. De forma parecida en las salinas de Isla Bacuta, *Halorubrum*, *Natronomonas* y *Haloarcula* fueron nuevamente los géneros de haloarqueas más representados, mientras que *Pseudomonas* y *Salicola* lo son de bacterias. En lo que respecta a los resultados obtenidos de las muestras de suelos en comparación con las de agua, ninguna bacteria pudo ser identificada y son los géneros *Haloarcula*, *Halorubrum* y *Halomicroarcula* los que suponen la mayor proporción de cepas aisladas a partir de este ambiente. Cabe destacar también que a pesar de la ausencia de representación bacteriana, la diversidad obtenida a nivel de género en este caso es mucho mayor a la obtenida en los ambientes acuáticos, debido posiblemente a la mayor heterogeneidad del suelo como hábitat.

Por otro lado, siguiendo los objetivos propuesto en la presente Tesis Doctoral, estos resultados fueron comparados con los descritos previamente en los estudios metagenómicos de las salinas de Isla Cristina y en los suelos salinos de las Marismas del Odiel (Fernández et al., 2014b; Vera-Gargallo & Ventosa, 2018). Dichos estudios metagenómicos mostraron que los géneros de haloarqueas más abundantes en las salinas de Isla Cristina son *Halorubrum* y *Natronomonas*, mientras *Haloarcula*, *Halorubrum*, *Natronomonas* y *Halolamina* lo son en las Marismas del Odiel. En lo referente a las bacterias halófilas, los géneros *Salinibacter* y *Psychroflexus* y *Salinibacter*, *Fodinibius* y *Salinimicrobium*, constituyen la mayor proporción de secuencias metagenómicas en Isla Cristina y en las Marismas del Odiel, respectivamente. Estos resultados se encuentran a grandes rasgos en concordancia con los obtenidos experimentalmente por cultivo puro en este trabajo (Figura 18).

Asimismo, tal y como se ha detallado en el apartado I.2.V. de la Introducción (Ecología y biodiversidad), otros estudios metagenómicos realizados en diferentes ambientes hipersalinos, tanto acuáticos como terrestres, han demostrado la abundancia de estos mismos géneros en diversos ecosistemas. Es por eso que, a pesar de que en numerosas ocasiones se ha descrito que los microorganismos frecuentemente aislados en el laboratorio no se corresponden con los datos obtenidos por metagenómica, podemos

indicar que en este caso en concreto si se observa una correlación entre los estudios basados en cultivo e independientes al mismo, lo que parece demostrar el éxito conseguido con los esfuerzos y la minuciosidad seguidos en la metodología concreta de esta Tesis Doctoral.

En lo que respecta al estudio filogenético de las cepas aisladas, una primera aproximación se basó en la comparación de las secuencias parciales del gen ARNr 16S. Los porcentajes de semejanza correspondientes, obtenidos en este trabajo con respecto a las especies ya descritas, estuvieron comprendidos entre 86,8 % y 99,9 %. De entre todas ellas, cabe destacar el aislamiento de varios grupos, más específicamente de 30 cepas, que presentaron porcentajes inferiores al 97-98 % o al 95 %, los cuales se seleccionaron para un estudio más detallado ante la posibilidad de que pudieran constituir nuevas especies o incluso nuevos géneros microbianos.

Seguidamente, se realizó la secuenciación casi completa del gen ARNr 16S (aproximadamente 1400 pb) de estos 30 aislados seleccionados (ver apartado III.5. de Material y Métodos) y cuyos resultados se detallan en la Tabla 12. La comparación de las secuencias resultantes indicó que éstos se encuentran relacionados con diversos géneros microbianos con porcentajes de semejanza variables entre 86,2 % y 97,9 %. Todos ellos fueron seleccionados para llevar a cabo un completo estudio polifásico que permitiera si así se confirmara, su descripción como nuevos taxones. Concretamente, se realizó un detallado análisis taxogenómico comparativo, en el que se incluyen las características filogenéticas, genotípicas, fenotípicas y quimiotaxonómicas de los aislados, la secuenciación de sus genomas y el cálculo de los parámetros como identidad nucleotídica media (ANI), identidad aminoacídica media (AAI) e hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH). Todo ello en comparación con las especies filogenéticamente más cercanas, que se utilizaron como referencia.

Algunos de estos grupos han sido objeto de análisis en este trabajo y cuyos resultados se detallan a continuación, mientras que los demás están siendo estudiados en la actualidad.

Tabla 12. Haloarqueas y bacterias halófilas seleccionadas como posibles nuevos taxones en base a la comparación de la secuencia casi completa del gen ARNr 16S.

Lugar de aislamiento	Dominio	Designación de la cepa	Especie filogenéticamente más relacionada	Semejanza (%)
Salina de Isla Cristina	Archaea	F13-25	<i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T	97,6
Salina de Isla Cristina	Archaea	F12-7	<i>Halorientalis brevis</i> YC89 ^T	95,9
Suelo M. Odiel	Archaea	F13	<i>Halomicroarcula limicola</i> YGHS32 ^T	96,5
Suelo M. Odiel	Archaea	F24A	<i>Halomicroarcula pellucida</i> BNERC31 ^T	95,3
Suelo M. Odiel	Archaea	F27	<i>Halomicroarcula salina</i> YGHS18 ^T	94,4
Suelo M. Odiel	Archaea	F28	<i>Halomicroarcula pellucida</i> BNERC31 ^T	95,3
Suelo M. Odiel	Archaea	F22B	<i>Halomicroarcula salina</i> YGHS18 ^T	95,3
Salina de Isla Cristina	Archaea	IC30-61	<i>Halomicroarcula limicola</i> YGHS32 ^T	96,7
Salina de Isla Bacuta	Archaea	F20-122	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	97,7
Salina de Isla Cristina	Archaea	F2-12	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	97,9
Salina de Isla Cristina	Archaea	F16-60	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	92,8
Salina de Isla Cristina	Archaea	F12-1	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	93,1
Salina de Isla Bacuta	Archaea	F17-44	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	93,1
Salina de Isla Bacuta	Archaea	F18-79	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	93,4
Salina de Isla Bacuta	Archaea	F19-13	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	92,8
Salina de Isla Bacuta	Archaea	F20-229	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	93,4
Salina de Isla Cristina	Archaea	F12-61	<i>Halonotius pteroides</i> 1.15.5 ^T	96,4
Salina de Isla Cristina	Archaea	F13-13	<i>Halonotius pteroides</i> 1.15.5 ^T	96,7
Suelo M. Odiel	Archaea	F15B	<i>Halonotius aquaticus</i> F13-13 ^T	96,4
Salina de Isla Cristina	Archaea	F9-27	<i>Halonotius pteroides</i> 1.15.5 ^T	96,9
Salina de Isla Cristina	Archaea	F2-221B	<i>Halonotius aquaticus</i> F13-13 ^T	97,9
Salina de Isla Cristina	Archaea	F3-133	<i>Haladaptatus pallidirubidus</i> YIM93656 ^T	86,2
Salina de Isla Cristina	Archaea	F16-84	<i>Haloplanus rallus</i> MBLA0036 ^T	96,6
Suelo M. Odiel	Archaea	S1-172	<i>Halobellus inordinatus</i> YC20 ^T	95,9
Salina de Isla Cristina	Archaea	F14-81	<i>Halovenus aranensis</i> EB27 ^T	94,2
Salina de Isla Cristina	Bacteria	F14-71	<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855 ^T	97,5
Salina de Isla Cristina	Bacteria	F2-10	<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855 ^T	97,5
Salina de Isla Cristina	Bacteria	F9-2	<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855 ^T	97,4
Salina de Isla Cristina	Bacteria	F1-7	<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855 ^T	97,6
Salina de Isla Cristina	Bacteria	F7-160	<i>Salinibacter ruber</i> DSM 13855 ^T	97,8

IV.2. Estudio de cepas pertenecientes al orden *Halobacteriales*

IV.2.1. Aislamiento y caracterización de la cepa F13-25^T

La cepa F13-25^T se aisló en cultivo puro a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Cristina (Huelva), que presentaba una salinidad del 27 % (p/v) y un pH de 7,5. Esta cepa se aisló en el medio de cultivo suplementado con glicerol (detallado en el apartado III.2.IV. de Material y Métodos), el cual también se utilizó para la conservación y el crecimiento rutinario de esta cepa.

Como se ha mencionado anteriormente, en primer lugar se procedió a la amplificación del gen ARNr 16S de esta cepa mediante PCR. Ante la posibilidad de que las cepas del género *Halorientalis* pudieran poseer más de una copia diferente del gen ARNr 16S, como ocurre con cepas de otros géneros descritos del orden *Halobacteriales*, el producto de PCR amplificado se clonó mediante el vector de clonación pGEM-T (ver apartado III.5.III. de Material y Métodos).

El estudio filogenético de la cepa F13-25^T, basado en experimentos de clonación, reveló la existencia de dos copias divergentes del gen ARNr 16S, designadas como *rrnA* y *rrnB*, con un porcentaje de semejanza entre ellas de un 93,1 %. La comparación de dichas secuencias, con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas, mostró que la cepa F13-25^T se encontraba estrechamente relacionada con las especies del género *Halorientalis*. Mientras que la secuencia *rrnA* se encontraba filogenéticamente más relacionada con *Halorientalis persicus* D108^T, *Halorientalis regularis* TNN28^T y *Halorientalis brevis* YC89^T, con porcentajes de semejanza de 99,2, 98,8 y 96,0 %, respectivamente, la secuencia *rrnB* lo estaba con *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T y *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T, con valores de 97,6 y 95,9 %, respectivamente. Más alejadas filogenéticamente se encontraban especies de otros géneros como *Halapricum*, *Halorhabdus* y *Halomicrobium* con porcentajes de semejanza de 94,2, 93,4 y 92,9 %.

Hasta la fecha, no se había descrito la presencia de multicopia divergente de este gen en las especies del género *Halorientalis*. Sin embargo, el hecho de que en nuestra cepa se detectara la presencia de dos copias divergentes nos hizo pensar que podrían también estar presentes en las especies de *Halorientalis*. De hecho, las secuencias experimentales correspondientes a la segunda copia (*rrnB*) de las especies ya descritas de este género no se encontraban en las bases de datos y para poder incluirlas en nuestro estudio, fue necesario obtenerlas del genoma de estas especies.

El árbol filogenético obtenido en base a dicho gen se muestra en la Figura 19. La construcción del mismo se llevó a cabo empleando tres algoritmos diferentes, *neighbour-joining*, *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood*. Como se puede observar, la secuencia *rrnA* de la cepa F13-25^T se encuentra formando una rama parafilética con las secuencias *rrnAs* de *Halorientalis*, pero se sitúa en una rama independiente reforzada con valores de *bootstrap* de 99 %; por otro lado, la secuencia *rrnB* de la cepa F13-25^T se agrupa monofiléticamente con aquellas secuencias *rrnBs* de *Halorientalis*, situándose una vez más en una rama independiente, con valores de *bootstrap* de 100 %. Esta topología hace pensar que pueda tratarse de una nueva especie dentro de dicho género.

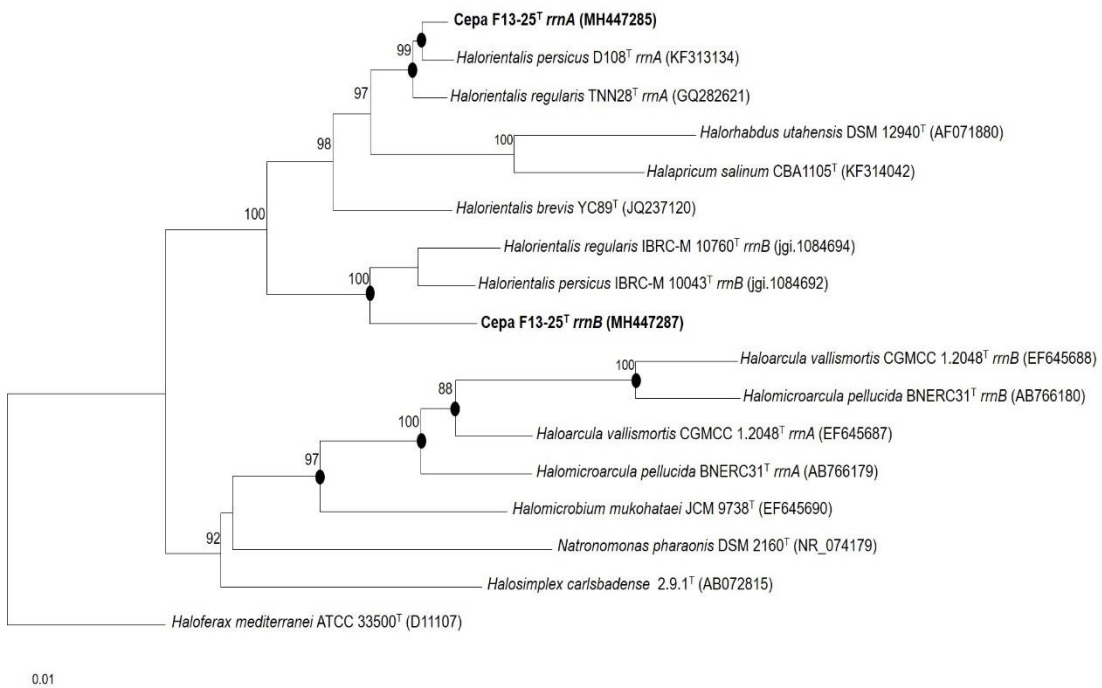


Figura 19. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-parsimony*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-25^T y las especies del género *Halorientalis* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con los algoritmos *maximum-likelihood* y *neighbour-joining*. La especie *Haloferax mediterranei* ATCC 33500^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

El estudio filogenético basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB*[′] ayudó a resolver las limitaciones que existen para el género *Halorientalis* en el caso del gen ARNr 16S. La construcción del árbol filogenético en base al gen *rpoB*[′] (Figura 20), muestra que la cepa F13-25^T se agrupa con *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T y *Halorientalis regularis* TNN28^T con porcentajes de semejanza entre dichas secuencias de 89,9 y 92,3 %, respectivamente, pero se sitúa en una rama diferente, lo suficientemente separada de las otras como para constituir una nueva especie dentro de este género.

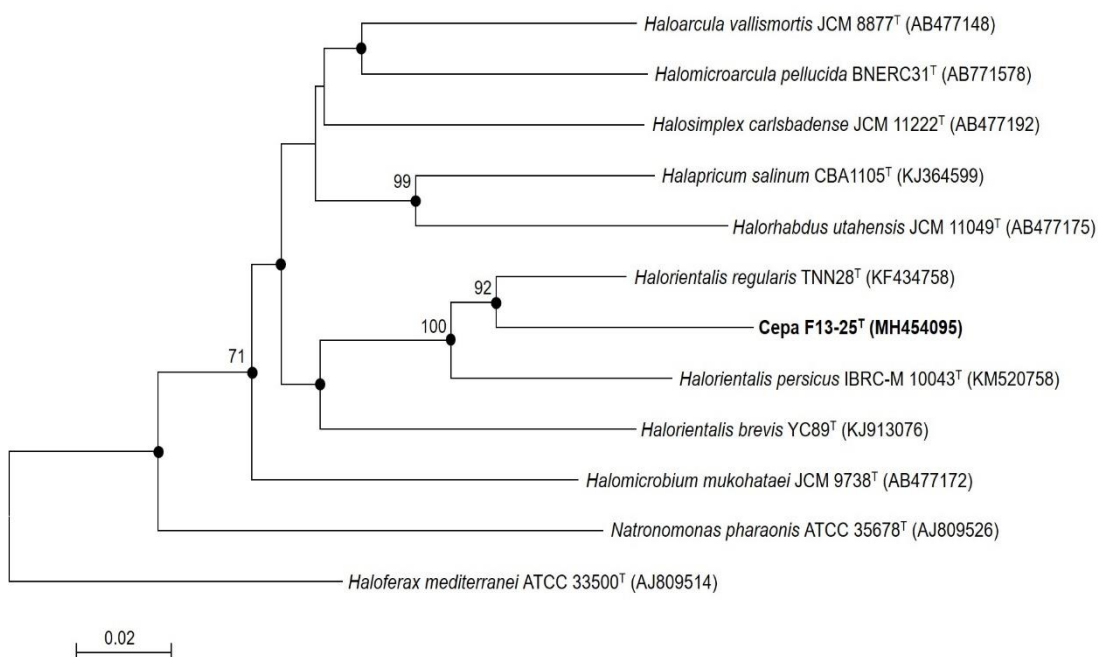


Figura 20. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining*, basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB*[′], en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-25^T y las especies del género *Halorientalis* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con el algoritmo *maximum-likelihood*. La especie *Haloferax mediterranei* ATCC 33500^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Asimismo, se procedió a la secuenciación del genoma de la cepa F13-25^T, cuyas principales características, junto a las de los genomas de las cepas tipo de las especies de *Halorientalis* más estrechamente relacionadas, se muestran en la Tabla 13. Estos parámetros se encuentran en concordancia con los estándares mínimos requeridos para el uso de genomas en taxonomía de procariotas (Chun et al., 2018).

Tabla 13. Características generales de los genomas de la cepa F13-25^T y de las cepas tipo de las especies del género *Halorientalis* utilizadas en este estudio.

Característica del genoma	Cepa F13-25 ^T	<i>Halorientalis regularis</i> IBRC-M 10760 ^T	<i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T
Tamaño (Mb)	4,09	4,03	4,87
N° de contigs	25	55	121
G+C (moles%)	65,7	65,0	63,5
N50	580694	245352	157375
N° de rRNAs	5	8	8
N° de tRNAs	48	64	75
Números de acceso	RDFA00000000	GCF_900102305	GCF_900110215

El contenido en G+C descrito para las especies *Halorientalis regularis* TNN28^T y *Halorientalis persicus* D108^T, inicialmente calculado mediante HPLC, era de 61,9 y 62,8 moles%, respectivamente (Cui et al., 2011; Amoozegar et al., 2014). Sin embargo, el calculado a partir del genoma fue de 65,0 y 63,5 moles%, respectivamente. El contenido en G+C de la cepa F13-25^T, determinado en este estudio a partir del genoma es de 65,7 moles%, valor que se encuentra dentro del rango descrito para las otras especies del género *Halorientalis*.

Con el propósito de confirmar si la cepa F13-25^T efectivamente constituía una nueva especie dentro del género *Halorientalis*, se calcularon los valores de identidad nucleotídica media (ANI) y los de hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH) (siguiendo la metodología descrita en el apartado III.8.III.II. de Material y Métodos) entre la cepa objeto de estudio, las especies del género *Halorientalis* y otros géneros relacionados (Tabla 14). Los valores de ANI y DDH obtenidos entre la cepa F13-25^T y *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T fueron de 88,8 % y 36,2 %, respectivamente, mientras que los de la cepa F13-25^T y *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T de 88,0 % y 34,6 %, respectivamente. Estos valores, al igual que los obtenidos frente a las otras especies de los géneros relacionados confirman que efectivamente se trata de una nueva especie dentro del género *Halorientalis*.

Gracias a la secuenciación del genoma de la cepa F13-25^T y a la existencia de los genomas disponibles para otras especies de géneros relacionados, se construyó un árbol filogenómico en base al número de genes compartidos (*core-orthologous*) entre todas ellas, en total 367 genes, y cuya representación se muestra en la Figura 21. Se puede observar que la cepa F13-25^T una vez más, aparece agrupada con las especies *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T y *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T con un valor de *bootstrap* de 100 %, pero situada en una rama diferente, lo suficientemente separada de las mismas, también con un valor de *bootstrap* de 100 %, confirmando nuevamente su condición de nuevo taxón dentro de este género.

Tabla 14. Matriz con los porcentajes de ANI y DDH obtenidos entre la cepa F13-25^T y las cepas tipo de las especies del género *Halorientalis* y otros géneros relacionados, de los que se dispone de sus genomas.

<i>In silico</i> DDH \ ANI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>Halorientalis</i> sp. F13-25 ^T	-	88,8	88,0	74,0	73,0	74,4	74,3	73,0	74,6	72,2
2. <i>Halorientalis regularis</i> IBRC-M 10760 ^T	36,2	-	89,1	73,9	73,0	74,5	74,2	73,3	74,6	72,3
3. <i>Halorientalis persicus</i> IBRC-M 10043 ^T	34,6	37,2	-	73,7	72,9	74,6	73,9	73,8	74,6	72,3
4. <i>Halapricum salinum</i> CBA 1105 ^T	19,6	20,5	20,0	-	73,8	74,0	73,8	72,9	74,0	71,5
5. <i>Halorhabdus utahensis</i> DSM 12940 ^T	19,3	20,0	20,2	19,8	-	73,0	72,6	72,0	73,2	71,1
6. <i>Halomicrobium mukohatei</i> DSM 12286 ^T	20,6	20,5	20,3	20,2	19,8	-	75,6	74,8	75,0	72,0
7. <i>Halomicroarcula pellucida</i> CECT 7537 ^T	20,1	20,1	20,1	19,8	19,3	20,4	-	78,0	74,7	72,0
8. <i>Haloarcula vallismortis</i> ATCC 29715 ^T	19,9	20,3	21,6	19,8	19,3	20,6	21,8	-	73,9	71,6
9. <i>Halosimplex carlsbadense</i> 2-9-1 ^T	20,5	20,6	20,7	20,4	19,9	20,9	20,5	20,7	-	72,2
10. <i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T	20,0	20,1	20,4	19,5	19,4	19,8	19,2	19,4	19,7	-

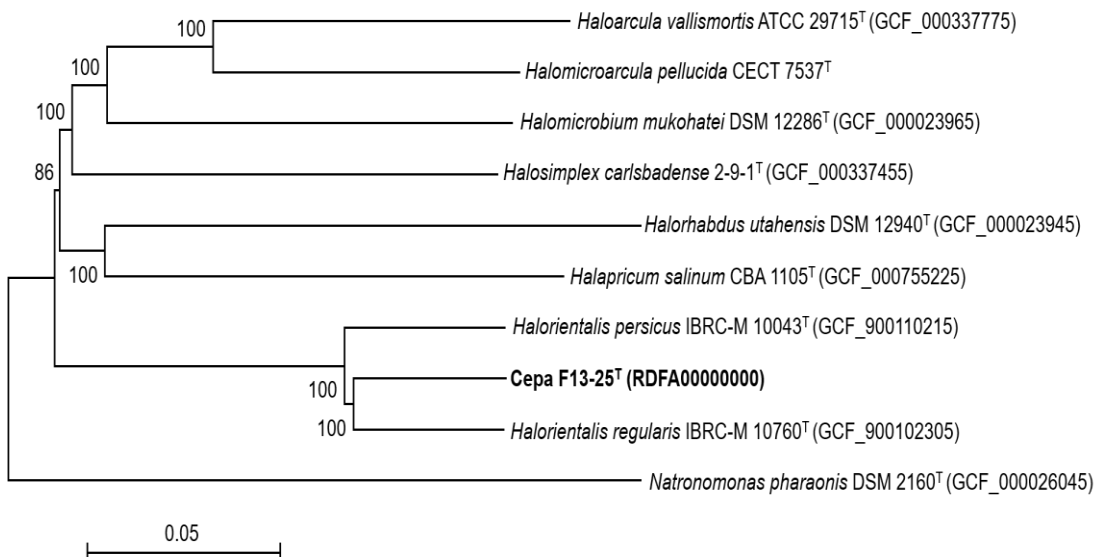


Figura 21. Árbol filogenómico obtenido por el método *neighbour-joining*, basado en la comparación de 367 genes *core-orthologous*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-25^T y las especies del género *Halorientalis* y de otros géneros filogenéticamente cercanos de los que se dispone de genomas. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Adicionalmente, se elaboró un diagrama de Venn para comparar el número de genes compartidos entre los genomas de la cepa F13-25^T y las cepas tipo de las especies de *Halorientalis* de las que se dispone de sus genomas (Figura 22). En total, *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T, *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T y la cepa F13-25^T comparten 2680 genes, *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T y la cepa F13-25^T comparten un total de 272, mientras que 256 son los genes compartidos entre *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T y la cepa F13-25^T. Por último, se identificaron 1003 genes como únicos para la cepa F13-25^T.

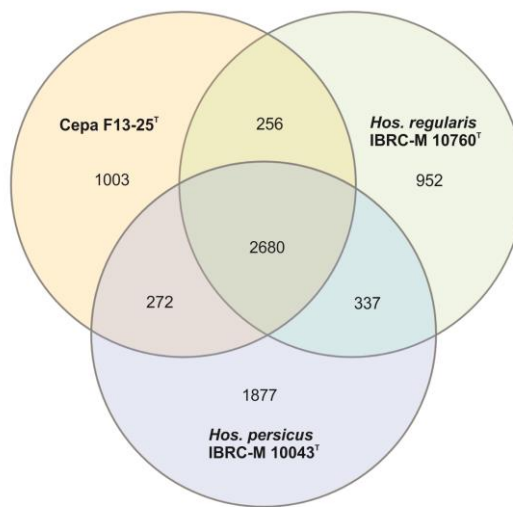


Figura 22. Diagrama de Venn que representa el número de genes compartidos entre los genomas de la cepa F13-25^T y de las cepas tipo de las especies de *Halorientalis* estudiadas.

Para la descripción de la cepa F13-25^T como una nueva especie del género *Halorientalis* se prosiguió con su caracterización fenotípica. En este estudio se utilizaron las cepas tipo de las especies *Halorientalis regularis* JCM 16425^T y *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T como cepas de referencia. La determinación de las características morfológicas y fisiológicas de la cepa F13-25^T se llevó a cabo siguiendo los requerimientos mínimos para la descripción de nuevos taxones del orden *Halobacteriales* (Oren et al., 1997).

Las células de la cepa F13-25^T se caracterizan por ser pequeñas formas cocoides, inmóviles y con un tamaño comprendido entre 1,1-2,8 x 0,5 µm (Figura 23). Se tiñen como Gram-negativas y en medio sólido crecen formando colonias con pigmentación rosácea, con borde entero y de aproximadamente 1 mm de tamaño. La cepa F13-25^T es capaz de crecer entre un 15 y un 30 % de sales totales, un pH de 6,5 a 8,5 y un rango de temperatura entre 30 y 50 °C, siendo su crecimiento óptimo a 25 % de sales, pH 7,5 y 37 °C. Presenta actividad oxidasa y catalasa y puede crecer en anaerobiosis en presencia de arginina, aunque no en presencia de dimetilsulfóxido o nitrato potásico. Hidroliza el Tween 80 pero no la gelatina ni el almidón. Las características diferenciales de esta cepa con respecto a las de las especies de *Halorientalis* utilizadas como referencia se detallan en la Tabla 15.



Figura 23. Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F13-25^T. Escala, 10 µm.

Tabla 15. Características que diferencian a la cepa F13-25^T de las especies *Halorientalis regularis* JCM 16425^T y *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T. **Cepas:** 1, F13-25^T; 2, *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T; 3, *Halorientalis regularis* JCM 16425^T. Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con: ^a tomados de Amoozegar *et al.*, (2014) y ^b tomados de Cui *et al.*, (2011) y +, Reacción positiva; -, reacción negativa.

Características	1	2	3
Morfología	Cocoides	Bacilos pleomórficos ^a	Bacilos ^b
Tamaño celular (µm)	1,1-2,8 x 0,5	0,7-1,0 x 1,0-2,0 ^a	0,5-1,0 x 1,0-6,0 ^b
Motilidad	-	+ ^a	+ ^b
Pigmentación de la colonia	Rojo	Crema ^a	Rojo ^b
NaCl óptimo (% p/v)	25	25 ^a	15 ^b
Requerimiento de Mg ²⁺	-	- ^a	+ ^b
Temperatura óptima (°C)	37	40 ^a	37 ^b
pH óptimo	7,5	7,5 ^a	7,0-7,5 ^b
Crecimiento en anaerobiosis en presencia de L-arginina	+	- ^a	- ^b
Hidrólisis del almidón	-	-	+
Contenido en G+C del ADN (moles%) (genoma)	65,7	63,5	65,0

En cuanto a la caracterización quimiotaxonómica, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado III.6. de Material y Métodos. Las especies *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T, *Halorientalis regularis* JCM 16425^T, *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T y *Halovenus aranensis* IBRC-M 10015^T se utilizaron como referencia en este estudio.

Con respecto al análisis de los lípidos polares, el resultado de la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) reveló la presencia de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1) en la cepa F13-25^T (Figura 24), siendo éstos además, los lípidos mayoritarios descritos para el género *Halorientalis* y demostrando una vez más su pertenencia a este género. Por otro lado, los resultados obtenidos muestran la presencia de dos fosfolípidos, fosfatidilglicerol (PG) y bifosfatidilglicerol (BPG) en las especies *Halorientalis regularis* JCM 16425^T y *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T, no detectados previamente en sus descripciones originales.

Para verificar estos resultados, se realizó nuevamente una cromatografía HPTLC utilizando en este caso azul de molibdeno como revelador, el cual es específico para fosfolípidos (Figura 25) y confirmando así la presencia de ambos fosfolípidos para las mencionadas especies. Este hallazgo, además de otras características relevantes determinadas en este estudio, nos ha permitido realizar una modificación de la descripción del género *Halorientalis*.

Los resultados obtenidos en este estudio referentes a la caracterización polifásica y genómica de la cepa F13-25^T, aislada a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Cristina, confirman que se trata de una nueva especie dentro del género *Halorientalis*, para la cual se propone el nombre de *Halorientalis pallida* sp. nov. La descripción de esta nueva especie ha sido publicada en 2019 en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Durán-Viseras et al., 2019a).

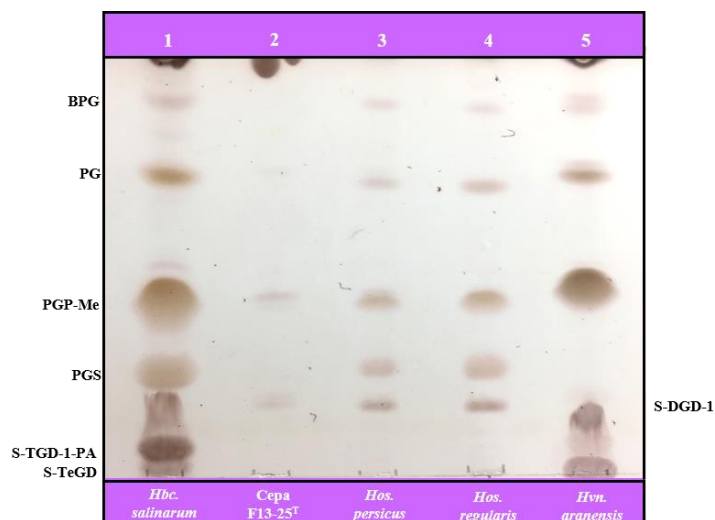


Figura 24. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F13-25^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C. Carriles: 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 2, Cella F13-25^T; 3, *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T; 4, *Halorientalis regularis* JCM 16425^T; 5, *Halovenus aranensis* IBRC-M 10015^T.

Abreviaciones: BPG, bifosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PGP-Me, fosfatidilglicerol fosfato metil éster; PGS, fosfatidilglicerol sulfato; S-DGD-1, sulfato diglicosil diéter; S-TGD-1-PA, ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico; S-TeGD, sulfato tetraglicosil diéter.

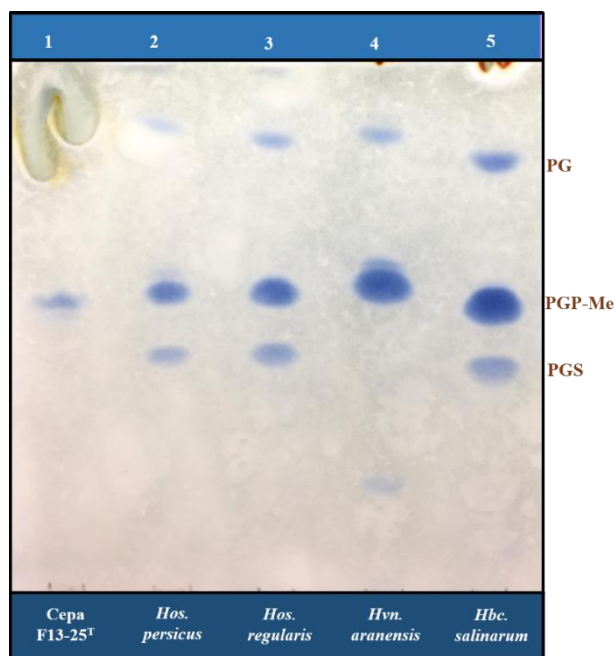


Figura 25. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de fosfolípidos de la cepa F13-25^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con azul de molibdeno. Carriles: 1, Cella F13-25^T; 2, *Halorientalis persicus* IBRC-M 10043^T; 3, *Halorientalis regularis* JCM 16425^T; 4, *Halovenus aranensis* IBRC-M 10015^T; 5, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T.

Abreviaciones: PG, fosfatidilglicerol; PGP-Me, fosfatidilglicerol fosfato metil éster; PGS, fosfatidilglicerol sulfato.

IV.2.I.I. Descripción de *Halorientalis pallida* sp. nov.

Halorientalis pallida (pal'li.da. L. fem. adj. *pallida*, que tiene un color poco intenso o pálido).

Las células son pequeñas formas cocoides, se tiñen como Gram-negativas, inmóviles, con un tamaño de 1,1-2,8 x 0,5 µm. Las colonias son circulares, de borde entero, de pigmentación ligeramente rosada y con un diámetro de apenas 1 mm en medio suplementado con glicerol después de 14 días de incubación a 37 °C. Arquea halófila extrema, capaz de crecer en un rango de 15 al 30 % (p/v) de sales totales y óptimamente al 25 % (p/v). El rango de pH en el que crece es de 6,5 a 8,5, y el de temperatura de 30 a 50 °C, con un crecimiento óptimo a pH 7,5 y 37 °C. Capaz de crecer en anaerobiosis en presencia de arginina, pero no en presencia de dimetilsulfóxido o nitrato potásico. Catalasa y oxidasa positivas. Hidroliza el Tween 80, pero no la gelatina ni el almidón.

Los lípidos polares mayoritarios son fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1). El contenido en G+C es 65,7 moles% (genoma).

La cepa tipo es F13-25^T (= CECT 9384^T = IBRC-M 11176^T), aislada a partir de un estanque de las salinas de Isla Cristina, Huelva.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S, *rrnA* y *rrnB*, y al gen *rpoB*' de la cepa tipo *Halorientalis pallida* F13-25^T, han sido depositadas en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ, bajo los números de acceso MH447285, MH447287 y MH454095, respectivamente. El genoma de la misma, también ha sido depositado allí con el número de acceso RDFA00000000.

IV.2.I.II. Descripción corregida del género *Halorientalis* (Cui et al., [2011]; correg. Amoozegar et al., [2014])

Las características del género *Halorientalis* son las mismas que las descritas por Cui et al., (2011) y Amoozegar et al., (2014), con las siguientes modificaciones.

Las especies pueden presentar dos copias divergentes del gen ARNr 16S. El contenido en G+C del ADN genómico oscila entre 63,5 y 65,7 moles% (obtenido a partir de las secuencias genómicas). El perfil de lípidos polares de las especies del género es el proporcionado por Cui et al., (2011), si bien además poseen fosfatidilglicerol (PG) y bifosfatidilglicerol (BPG).

IV.2.II. Aislamiento y caracterización de la cepa F20-122^T

De entre todas las colonias seleccionadas inicialmente, se ha conseguido aislar en cultivo puro en el laboratorio una haloarquea, designada como F20-122^T, la cual se aisló a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Bacuta, localizadas en la provincia de Huelva. El medio de cultivo utilizado para su aislamiento fue el R2A al 25 % de sales (apartado III.2.II. de Material y Métodos).

El estudio filogenético inicial basado en la secuenciación parcial del gen ARNr 16S de esta cepa (de aproximadamente 700 pb), mostró un bajo porcentaje de semejanza con respecto a las especies descritas del género *Natronomonas*. Con el objetivo de determinar en detalle la posición taxonómica precisa de esta cepa, se llevó a cabo una completa caracterización taxonómica y genómica de la misma.

La secuencia casi completa del gen ARNr 16S de la cepa F20-122^T (1400 pb) confirmó que se encontraba relacionada desde un punto de vista filogenético con las especies del género *Natronomonas*, *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T y *Natronomonas gomsonensis* SA3^T, con porcentajes de semejanza de 97,7, 97,4 y 96,1 %, respectivamente. Los porcentajes de semejanza obtenidos con respecto a otros géneros cercanos como *Salinirubellus* o *Halomarina*, fueron en todos los casos iguales o inferiores al 90,7 %.

El árbol filogenético obtenido en base a la comparación de secuencias de dicho gen (Figura 26), muestra que la cepa F20-122^T se agrupa con las especies ya descritas del género *Natronomonas*, pero se encuentra localizada en una rama diferente a todas ellas, con valores de *bootstrap* de 100 %, sugiriendo así, que pudiera tratarse de una nueva especie de dicho género. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizaron los algoritmos *maximum-parsimony*, *maximum-likelihood* y *neighbour-joining*.

Dado que el gen ARNr 16S ha demostrado no ser un marcador fiable para el estudio de las relaciones filogenéticas en haloarqueas, es necesario utilizar otras aproximaciones para las que se recomienda como alternativa el gen *housekeeping rpoB*[′]. El estudio filogenético basado en dicho gen para la cepa F20-122^T (611 pb) mostró porcentajes de semejanza de 88,0, 87,3 y 86,5 % con *Natronomonas gomsonensis* SA3^T, *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T y *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T, respectivamente. La representación del árbol filogenético en base a dicho gen se muestra en la Figura 27, en la cual la cepa F20-122^T vuelve a agruparse con las especies ya descritas del género *Natronomonas*, si bien se sitúa en una rama independiente a ellas. Esta topología se mantiene estable con el uso de diferentes algoritmos.

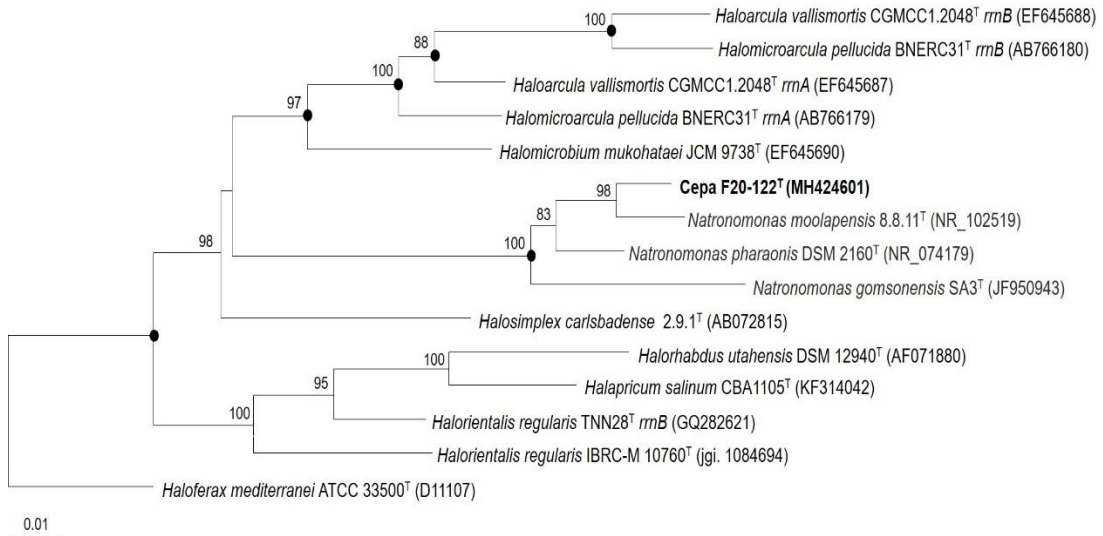


Figura 26. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-parsimony*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F20-122^T y las cepas tipo de las especies del género *Natronomonas* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con los algoritmos *maximum-likelihood* y *neighbour-joining*. La especie *Haloferax mediterranei* ATCC 33500^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

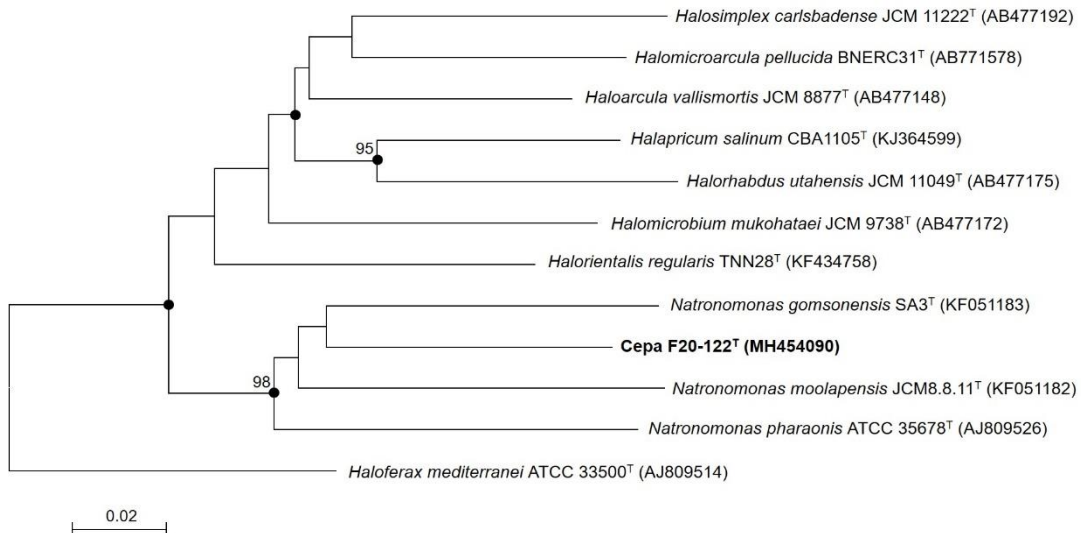


Figura 27. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining*, basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F20-122^T y las especies del género *Natronomonas* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con el algoritmo *maximum-likelihood*. La especie *Haloferax mediterranei* ATCC 33500^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Por otro lado, se ha secuenciado el genoma de la cepa F20-122^T el cual se ha comparado con el de la especie tipo del género, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T y con el de la especie filogenéticamente más próxima, *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T. Las principales características de estos genomas se muestran en la Tabla 16. Todas las características del genoma de la cepa F20-122^T cumplen los estándares mínimos recomendados para el uso de genomas en taxonomía de procariotas (Chun et al., 2018).

El genoma de la cepa F20-122^T se ha ensamblado en 13 contigs y su tamaño (2,9 Mb) es idéntico al de *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T, por otra parte, el contenido en G+C del ADN (63,2 moles%) y el número de rRNAs (3) y tRNAs (44) también resultan similares a los de las otras especies; por tanto, estas características entrarían dentro del rango descrito para las especies del género *Natronomonas*.

Tabla 16. Características generales de los genomas de la cepa F20-122^T y de las especies del género *Natronomonas* utilizadas en este estudio.

Característica del genoma	Cepa F20-122 ^T	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T
Tamaño (Mb)	2,9	2,6	2,9
N° de contigs	13	1	1
G+C (moles%)	63,2	63,4	64,5
N° de rRNAs	3	3	3
N° de tRNAs	43	44	47
Números de acceso	QKNX000000000	GCF_000026045	GCF_000591055

Con el objetivo de determinar si la cepa F20-122^T constituía una nueva especie dentro del género *Natronomonas*, se realizaron estudios de hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH) e identidad nucleotídica media (ANI). La Tabla 17 recoge los resultados del cálculo de estos parámetros. Todos los valores, inferiores al 70 % y 95 %, para DDH y ANI, respectivamente, confirman que efectivamente la cepa F20-122^T es genotípicamente distinta y debe ser clasificada como una nueva especie dentro del género *Natronomonas*.

Asimismo, ya que se disponía del genoma de la cepa F20-122^T, los genomas de las especies ya descritas de *Natronomonas*, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T y *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T y otros genomas de especies de géneros relacionados, se construyó un árbol filogenómico en base al número total de genes compartidos (core-genoma) entre todas ellas, y que permitiera determinar así con mayor precisión, la posición filogenómica exacta de la cepa F20-122^T. Estos resultados se muestran en la Figura 28. En total, todos los genomas analizados comparten 319 genes, y una vez más, se observa que la cepa F20-122^T aparece agrupada con las especies de *Natronomonas*, pero se localiza en una

rama diferente filogenéticamente distante a ellas, con valores de *bootstrap* de 100 % en ambos casos, demostrando su condición de nuevo taxón dentro de este género.

Tabla 17. Matriz con los porcentajes de ANI y DDH obtenidos entre la cepa F20-122^T y las especies del género *Natronomonas* y otros géneros relacionados.

<i>In silico</i> DDH \ ANI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>Natronomonas</i> sp. F20-122 ^T	-	75,9	79,8	71,8	71,3	72,5	72,3	71,6	72,7	72,6
2. <i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T	21,3	-	76,5	71,5	71,2	72,1	72,0	71,6	72,2	72,4
3. <i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	23,5	21,5	-	72,2	71,9	72,9	72,6	71,9	72,6	72,8
4. <i>Halapricum salinum</i> CBA 1105 ^T	19,2	19,5	19,6	-	73,8	74,0	73,8	72,9	74,0	73,9
5. <i>Halorhabdus utahensis</i> DSM 12940 ^T	18,6	19,4	19,1	19,8	-	73,1	72,6	72,1	73,3	73,0
6. <i>Halomicrobium mukohatei</i> DSM 12286 ^T	19,3	19,8	19,4	20,2	19,8	-	75,6	74,8	75,1	74,5
7. <i>Halomicroarcula pellucida</i> CECT 7537 ^T	19,1	19,2	19,4	19,8	19,3	20,4	-	78,0	74,7	74,2
8. <i>Haloarcula vallismortis</i> ATCC 29715 ^T	19,5	19,4	19,7	19,8	19,3	20,6	21,8	-	73,9	73,3
9. <i>Halosimplex carlsbadense</i> 2-9-1 ^T	20,0	19,7	20,0	20,4	19,9	20,9	20,5	20,7	-	74,6
10. <i>Halorientalis regularis</i> IBRC-M 10760 ^T	19,8	20,1	20,5	20,5	20,0	20,5	20,1	20,3	20,6	-

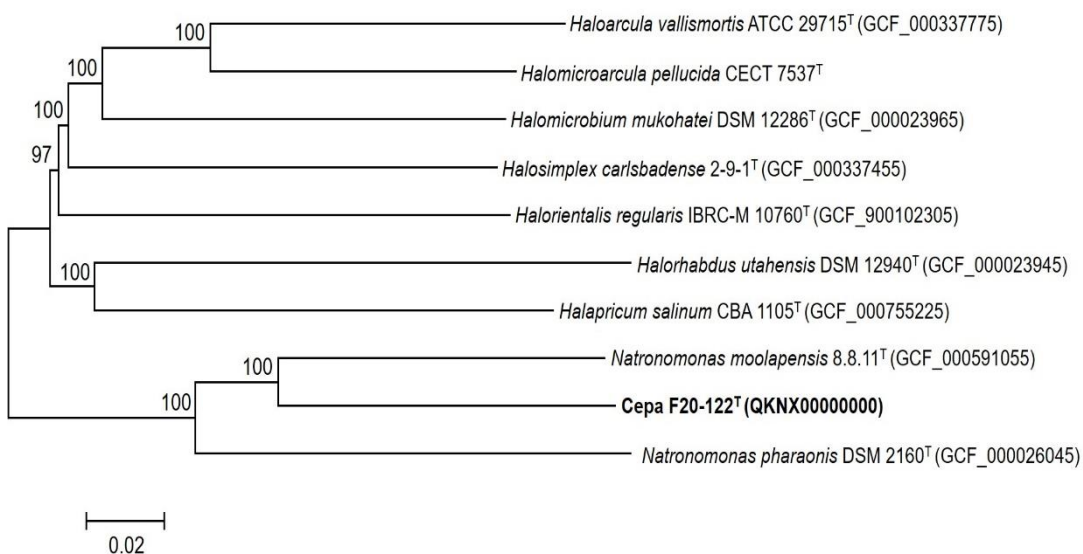


Figura 28. Árbol filogenómico obtenido por el método *neighbour-joining*, basado en la comparación de 319 genes *core-orthologous*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F20-122^T y las especies del género *Natronomonas* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Para realizar la caracterización fenotípica de la cepa F20-122^T se han seguido las recomendaciones de los estándares mínimos recomendados para la descripción de nuevos taxones del orden *Halobacteriales* (Oren et al., 1997).

Las colonias de la cepa F20-122^T poseen pigmentación rosa, son circulares, de borde entero y tienen un tamaño alrededor de 0,2-0,3 mm de diámetro. En fase exponencial, las células observadas por microscopía de contraste de fases, son pequeños bacilos o formas cocoides, inmóviles y de 1-1,2 x 2,5 µm de tamaño (Figura 29).

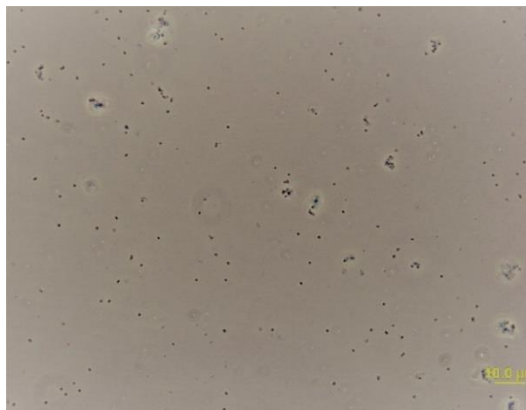


Figura 29. Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F20-122^T. Escala, 10 µm.

Las características fenotípicas de la cepa F20-122^T se detallan en la descripción taxonómica de la nueva especie. En la Tabla 18 se muestran las características diferenciales entre la cepa F20-122^T y *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. Debido al carácter alcalófilo de *Natronomonas pharaonis*, la especie tipo del género, y a su incapacidad para crecer en el medio óptimo no alcalófilo de la cepa F20-122^T, ésta no ha sido incluida en la caracterización fenotípica comparativa.

Para el estudio quimiotaxonómico se siguió la metodología descrita en el apartado III.6. de Material y Métodos. En este estudio se han utilizado como cepas de referencia las especies *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137^T y *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T.

Los resultados correspondientes a la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) (Figura 30), indican que la cepa F20-122^T contiene fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), ambos derivados de diferentes cadenas de longitud C₂₀C₂₀ y C₂₀C₂₅, así como fosfatidilglicerol sulfato (PGS), como lípidos mayoritarios. También se detectó la presencia de trazas de bifosfatidilglicerol (BPG), otros fosfolípidos menores y glicolípidos no identificados.

A excepción de *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T, la cepa F20-122^T comparte los lípidos mayoritarios descritos para las otras especies del género *Natronomonas*; sin embargo, cabe destacar la presencia de doble cadena de diferente longitud C₂₀C₂₀ y C₂₀C₂₅ de derivados de fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me) en su

perfil lipídico, que no suele estar presente en el perfil de lípidos de haloarqueas neutrófilas. El perfil lipídico de las especies del género *Natronomonas* indica una divergencia y variabilidad en la composición de los lípidos de membrana de las mismas. De hecho, este género, incluye especies alcalófilas y neutrófilas, sugiriendo así una mayor adaptación de estas cepas a ambientes con un pH fluctuante.

Tabla 18. Características que diferencian a la cepa F20-122^T de la especie *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. **Cepas:** 1, F20-122^T; 2, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con *, tomados de Burns et al., (2010a). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.

Características	1	2
Morfología	Cocobacilos	Pleomórfica*
Motilidad	-	+
Tamaño celular (µm)	1-1,2 x 2,5	0,7 x 1,7*
Tamaño de la colonia (mm)	0,2-0,3	0,5
Pigmentación	Rosa	Roja*
Rango y óptimo NaCl (% p/v)	10-30 (25)	14-36* (18-20)*
Rango y óptimo temperatura (°C)	25-50 (37)	25-45* (ND)*
Rango y óptimo pH	6,5-9,0 (8,0)	5,5-8,5* (7,0-7,5)*
Oxidasa	+	-
Reducción de nitritos	-	+
Producción de ácidos ^a :		
Arbutina	w	-
L-Citrulina	w	-
Dulcitol	w	-
D-Galactosa	w	-
Glicerol	-	w
D-Glucosa	+	-
Inulina	w	-
Lactosa	w	-
D-Maltosa	w	-
D-Manitol	w	-
D-Melecitosa	w	-
D-Rafinosa	w	-
Sorbitol	w	-
D-Trealosa	w	-
L-Xilitol	w	-
Utilización de ^a :		
Butanol	-	+
Etanol	-	+
Glucosa	-	+
Glicerol	-	+
Propanol	-	+
Salicina	-	+
Isoleucina	-	+
Contenido en G+C del ADN (moles%, genoma)	63,2	64,5

^aComo única fuente de carbono y energía (carbohidratos y alcoholes) o de carbono, nitrógeno y energía (aminoácidos).

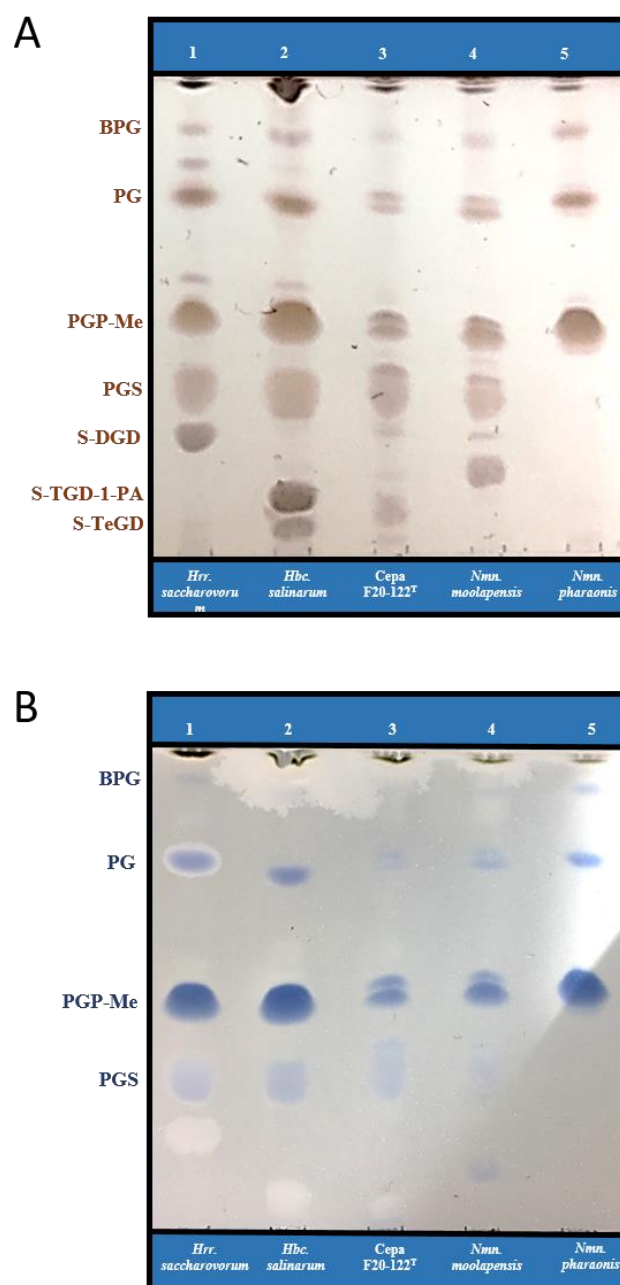


Figura 30. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F20-122^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con **A)** ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C y **B)** azul de molibdeno. **Carriles:** 1, *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137^T; 2, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 3, Cepa F20-122^T; 4, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T; 5, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T.

Abreviaciones: BPG, bifosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PGP-Me, fosfatidilglicerol fosfato metil éster; PGS, fosfatidilglicerol sulfato; S-DGD-1, sulfato diglicosil diéter; S-TGD-1-PA, ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico; S-TeGD, sulfato tetraglicosil diéter.

La caracterización polifásica llevada a cabo en este trabajo mediante la combinación de estudios filogenéticos, fenotípicos, quimiotaxonómicos y genómicos demuestran que la cepa F20-122^T constituye una nueva especie dentro del género *Natronomonas*, para la cual proponemos la denominación de *Natronomonas salsuginis* sp. nov.

IV.2.II.1. Descripción de *Natronomonas salsuginis* sp. nov.

Natronomonas salsuginis (sal.su'gi.nis. L. gen. n. *salsuginis*, que proviene de agua salada).

Las células son bacilos cortos o formas cocoides de tamaño comprendido entre 1-1,2 x 2,5 µm, inmóviles y se tiñen como Gram-negativas. Aerobio estricto, incapaz de crecer en anaerobiosis en presencia de L-arginina, dimetilsulfóxido o nitrato potásico. Las colonias presentan pigmentación rosa, y son circulares, con borde entero y miden entre 0,2 y 0,3 mm de diámetro. Halófilo extremo, crece en un rango de salinidad entre el 10 y el 30 % (p/v) y óptimamente al 25 % (p/v) de sales. No se observa crecimiento en ausencia de NaCl. Capaz de crecer en un rango de temperaturas de 25 a 50 °C (óptimamente a 37 °C) y en un intervalo de pH de 5,0 a 9,0 (óptimamente a pH 7,5). Catalasa negativa y oxidasa positiva. No hidroliza la gelatina, el almidón, ni la esculina. Reduce los nitratos y los nitritos. No produce H₂S. Las pruebas de Voges-Proskauer, citrato de Simmons, ureasa y producción de indol son negativas. La prueba del rojo de metilo es positiva. Produce ácidos a partir de los siguientes carbohidratos: D, L-arabinosa, D-fructosa, D-glucosa y D-xilosa, pero no a partir de D-amigdalina, D,L-etionina, glicerol o sacarosa. Ninguno de los sustratos ensayados fue utilizado como única fuente de carbono y energía. Utiliza L-alanina, L-ornitina, L-glicina, L-lisina, L-treonina y L-valina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, pero no L-arginina, asparragina, ácido aspártico, L-cisteína, fenilalanina, glutamina, L-metionina, L-serina, triptófano e isoleucina.

Los lípidos polares incluyen fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me) y fosfatidilglicerol sulfato (PGS) como lípidos mayoritarios, así como trazas de bifosfatidilglicerol (BPG), otros fosfolípidos menores y glicolípidos no identificados. El contenido en G+C del ADN es de 63,2 moles% (genoma).

La cepa tipo es F20-122^T (= CECT 9564^T = CCM 8891^T), aislada a partir de un estanque de las salinas de Isla Bacuta, Huelva.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S y al gen *rpoB* de la cepa tipo *Natronomonas salsuginis* F20-122^T han sido depositadas en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ, bajo los números de acceso MH424601 y MH454090, respectivamente. El genoma de la misma, también ha sido depositado allí con el número de acceso QKNX00000000.

IV.2.III. Aislamiento y caracterización de la cepa F16-60^T

Otra de las cepas aisladas en esta Tesis Doctoral, es la cepa F16-60^T, aislada a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Cristina (32 % [p/v] NaCl y pH 7,5), concretamente en el medio preparado utilizando el agua filtrada de las salinas sin nutrientes añadidos.

El estudio de la secuencia casi completa del gen ARNr 16S (1400 pb) mostró que las secuencias filogenéticamente más cercanas a la cepa F16-60^T eran las correspondientes a las especies *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T y *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T, con porcentajes de semejanza de 92, 8 y 92,6 %, respectivamente. La construcción del árbol filogenético en base a este gen empleando el algoritmo *maximum-likelihood*, mostró que la cepa F16-60^T constituía una rama filogenéticamente distante al género *Natronomonas*, soportado con valores elevados de *bootstrap* e independiente también de cualquier otro género previamente descrito del orden *Halobacteriales*, lo que suscitaba la posibilidad de que pudiera tratarse de un nuevo género dentro de este orden no descrito hasta la fecha (Figura 31). Se obtuvieron resultados similares utilizando los algoritmos *neighbour-joining* y *maximum-parsimony*.

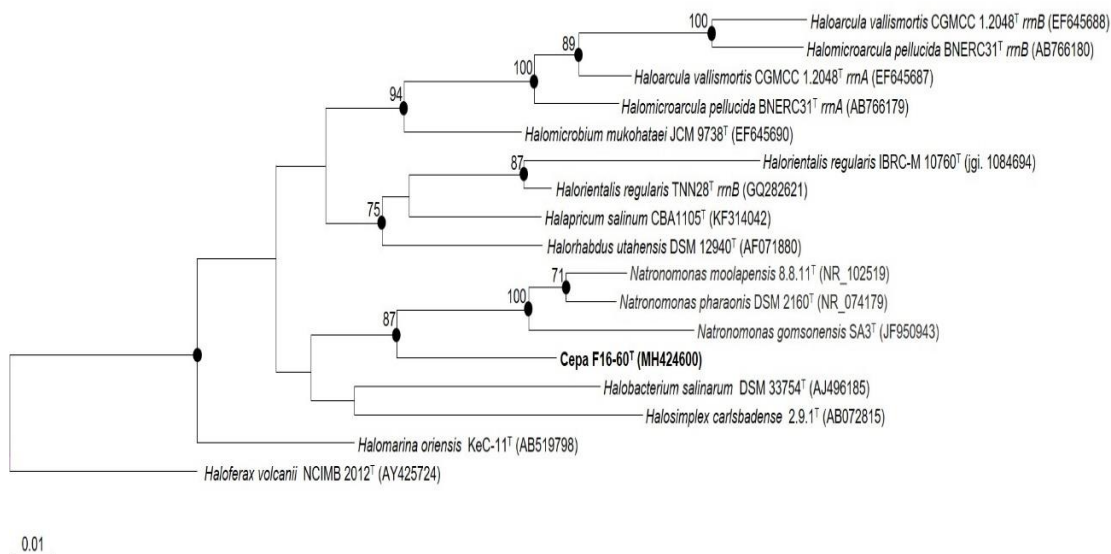


Figura 31. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F16-60^T y las cepas tipo de las especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con los algoritmos *maximum-parsimony* y *neighbour-joining*. La especie *Haloferax volcanii* NCIMB-2012^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

En el caso concreto de las haloarqueas, dadas las limitaciones descritas del gen ARNr 16S, se necesitan otras aproximaciones filogenéticas (Boucher *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2013). Por esta razón también se secuenció el gen *rpoB* de la cepa F16-60^T (1848 pb) y se comparó con el de las especies relacionadas filogenéticamente. El árbol filogenético obtenido con las secuencias correspondientes a este gen y en base al algoritmo *maximum-likelihood* (Figura 32) muestra que nuevamente la cepa objeto de estudio (F16-60^T) se sitúa en una rama filogenética independiente, separada de las especies del género *Natronomonas* y del resto de géneros del orden *Halobacteriales*, lo que apoya la hipótesis formulada de que pueda tratarse de un nuevo género microbiano. La construcción del árbol filogenético empleando el algoritmo *neighbour-joining* mostró resultados similares. Además, la matriz de semejanza obtenida muestra que los valores de semejanza entre la cepa F16-60^T y las especies representadas en el árbol era en todos los casos inferior al 87,2 %.

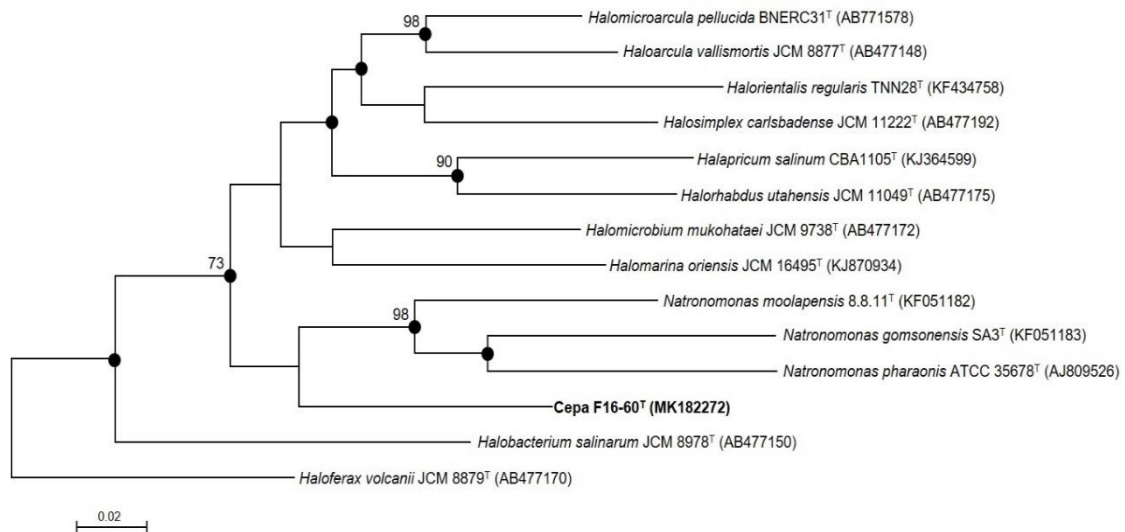


Figura 32. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining*, basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F16-60^T y las cepas tipo de las especies de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o superiores al 70 %. Los círculos negros representan los nodos igualmente obtenidos con el algoritmo *neighbour-joining*. La especie *Haloferax volcanii* JCM 8879^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Por otro lado, para poder llevar a cabo un estudio lo más preciso posible y de acuerdo a los requisitos de la actual taxonomía de procariotas, se secuenció el genoma de la cepa F16-60^T, sus principales características se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Características generales del genoma de la cepa F16-60^T.

Característica	Cepa F16-60 ^T
Tamaño (Mb)	4,0
Nº de contigs	54
Compleitud (%)	97,6
G+C (moles%)	68,0
N50 (pb)	274728
Total genes	3922
Nº de CDS	3673
Nº de ARNr	4
Nº de ARNt	53
Número de acceso	QMDX00000000

El genoma de la cepa F16-60^T se ensambló en 54 contigs, su tamaño es de 4,0 Mb y su contenido en G+C de 68,0 moles% (Tabla 19). Tanto el tamaño del genoma como su contenido en G+C se encuentran dentro del rango descrito para el orden *Halobacteriales*. Por otro lado, el valor de N50 es de 274728 pb y el contenido en genes codificantes de proteínas (CDS) de 3673 (Tabla 19). Todas estas características cumplen los requisitos mínimos establecidos por Chun y colaboradores (2018) para el uso de genomas en taxonomía de procariotas.

Adicionalmente, con el fin de determinar el número total de genes compartidos entre la cepa F16-60^T y las especies más cercanas filogenéticamente, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T y *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T, se construyó un Diagrama de Venn representado en la Figura 33. El total de genes compartidos entre los tres genomas es de 371, mientras que la cepa F16-60^T por su parte, comparte 97 y 172 genes con *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T y *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T, respectivamente.

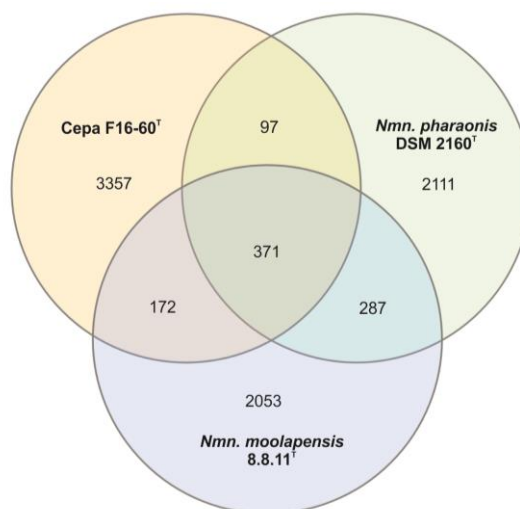


Figura 33. Diagrama de Venn que representa el número de genes compartidos entre los genomas de la cepa F16-60^T, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T y *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T.

Una vez se dispuso del genoma ensamblado y para poder definir con mayor sensibilidad la posición filogenómica del nuevo aislado, se construyó el árbol filogenómico en base al número total de genes ortólogos compartidos (170) entre la cepa F16-60^T, las especies del género *Natronomonas* más cercanas filogenéticamente y las demás especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales* con genomas disponibles. Los resultados se muestran en la Figura 34, una vez más, la cepa F16-60^T aparece situada en una rama diferente, lo suficientemente distante de los otros grupos como para constituir un género nuevo y soportado con un valor de *bootstrap* del 68 %.

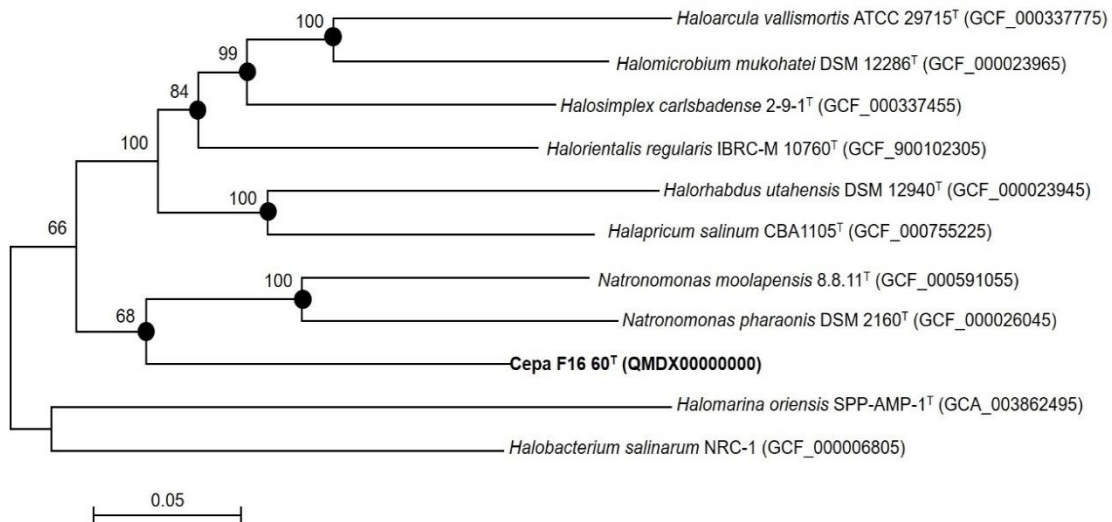


Figura 34. Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de 170 genes *core-orthologous*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F16-60^T y las especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Teniendo en cuenta estos resultados y para poder confirmar la condición de nuevo género microbiano, se calcularon los valores de identidad aminoacídica media (AAI), identidad nucleotídica media (ANI) e hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH), entre la cepa F16-60^T y el resto de genomas analizados del orden *Halobacteriales*, actualmente los criterios más aceptados para la delineación de nuevos taxones. Todos estos resultados se muestran en la Figura 35 y en la Tabla 20. Los resultados de los porcentajes de ANI y DDH fueron en todos los casos inferiores a 95 y 70 %, respectivamente (Figura 35), los cuales representan los valores de corte establecidos para la delineación a nivel de especie (Stackebrandt & Goebel, 1994; Konstantinidis & Tiedje, 2004; Richter & Rosselló-Móra, 2009; Auch *et al.*,

2010a). Esto refleja que la cepa F16-60^T al menos, constituye una nueva especie no relacionada con ninguna de las otras especies descritas previamente; no obstante, cabe señalar que en los casos en los que los valores de ANI entre especies se sitúan por debajo del 80 %, Rodríguez-R & Konstantinidis (2014), indican que se trata de taxones muy divergentes y que la capacidad de resolución de ANI en estos casos es muy limitada, por lo que recomiendan el cálculo del AAI. Es por eso que se calcularon los valores de este parámetro (Tabla 20); en este caso los resultados fueron inferiores al 65 % entre el genoma de la cepa F16-60^T y los demás genomas comparados, lo que confirma que efectivamente se trata de un nuevo género dentro del orden *Halobacteriales* (Klappenbach et al., 2007; Konstantinidis et al., 2017).

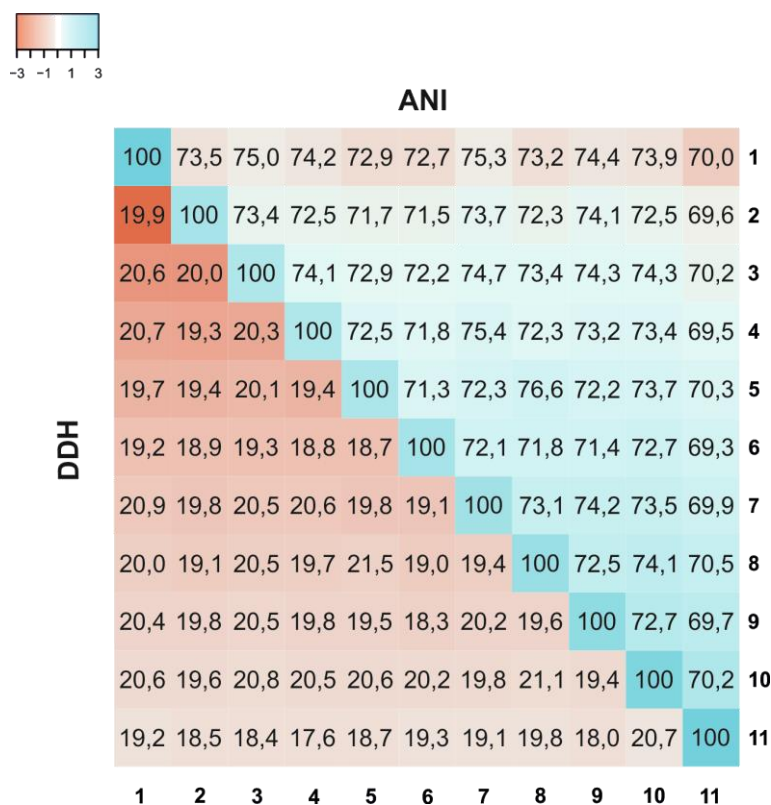


Figura 35. Matriz de semejanza mostrando los porcentajes de identidad nucleotídica media (ANI) e hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH), entre el genoma de la cepa F16-60^T y los genomas de las especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los valores de ANI y DDH se representan mediante mapas de calor, cuyos valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte superior de la figura. Cepas: 1, *Halosimplex carlsbadense* 2-9-1^T; 2, *Halorhabdus utahensis* DSM 12940^T; 3, *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T; 4, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715^T; 5, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T; 6, *Halobacterium salinarum* NRC-1^T; 7, *Halomicrobium mukohatei* DSM 12286^T; 8, *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T; 9, *Halapricum salinum* CBA 1105^T; 10, Cepa F16-60^T; 11, *Halomarina oriensis* SPP-AMP-1^T.

Tabla 20. Porcentajes de identidad aminoacídica media (AAI) entre la cepa F16-60^T y los genomas de las especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales*. **Cepas:** 1, *Halosimplex carlsbadense* 2-9-1^T; 2, *Halorhabdus utahensis* DSM 12940^T; 3, *Halorientalis regularis* IBRC-M 10760^T; 4, *Haloarcula vallismortis* ATCC 29715^T; 5, *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T; 6, *Halobacterium salinarum* NRC-1^T; 7, *Halomicrobium mukohatei* DSM 12286^T; 8, *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T; 9, *Halapricum salinum* CBA 1105^T; 10, Cepa F16-60^T; 11, *Halomarina oriensis* SPP-AMP-1^T.

AAI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	64,0	65,2	65,2	62,8	61,6	65,9	62,4	65,1	62,5	61,3
2	-	-	64,0	63,9	62,7	60,8	64,4	62,2	66,3	61,8	61,1
3	-	-	-	65,3	64,0	62,1	65,6	63,8	65,3	64,0	62,9
4	-	-	-	-	62,5	61,5	68,7	62,9	65,4	63,1	61,7
5	-	-	-	-	-	62,7	63,3	73,0	63,2	64,9	62,4
6	-	-	-	-	-	-	61,9	61,2	61,3	61,4	60,6
7	-	-	-	-	-	-	-	63,4	65,9	62,9	61,9
8	-	-	-	-	-	-	-	-	63,0	64,6	62,5
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62,4	62,0
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62,0
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En base a los resultados del análisis filogenético, filogenómico y a los valores de ANI, DDH y AAI obtenidos, podemos confirmar que la cepa F16-60^T constituye un nuevo género y con una única especie dentro del orden *Halobacteriales*. Teniendo en cuenta su mayor relación filogenómica con especies de la familia *Haloarculaceae*, proponemos su afiliación a dicha familia con las nuevas denominaciones de *Haloglomus* gen. nov. y *Haloglomus irregulare* sp. nov.

Por otro lado, para poder realizar la descripción formal como nuevo género y especie, se llevó a cabo una completa caracterización quimiotaxonómica y fenotípica del nuevo aislado.

Para el análisis de los lípidos polares, mediante cromatografía en capa fina (HPTLC), se comparó el perfil lipídico de la cepa F16-60^T con el de las especies más relacionadas, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T y *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. También se utilizaron *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T y *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137^T como patrones de referencia. Los lípidos polares de la cepa F16-60^T incluyen fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1), como lípidos mayoritarios (Figura 36).

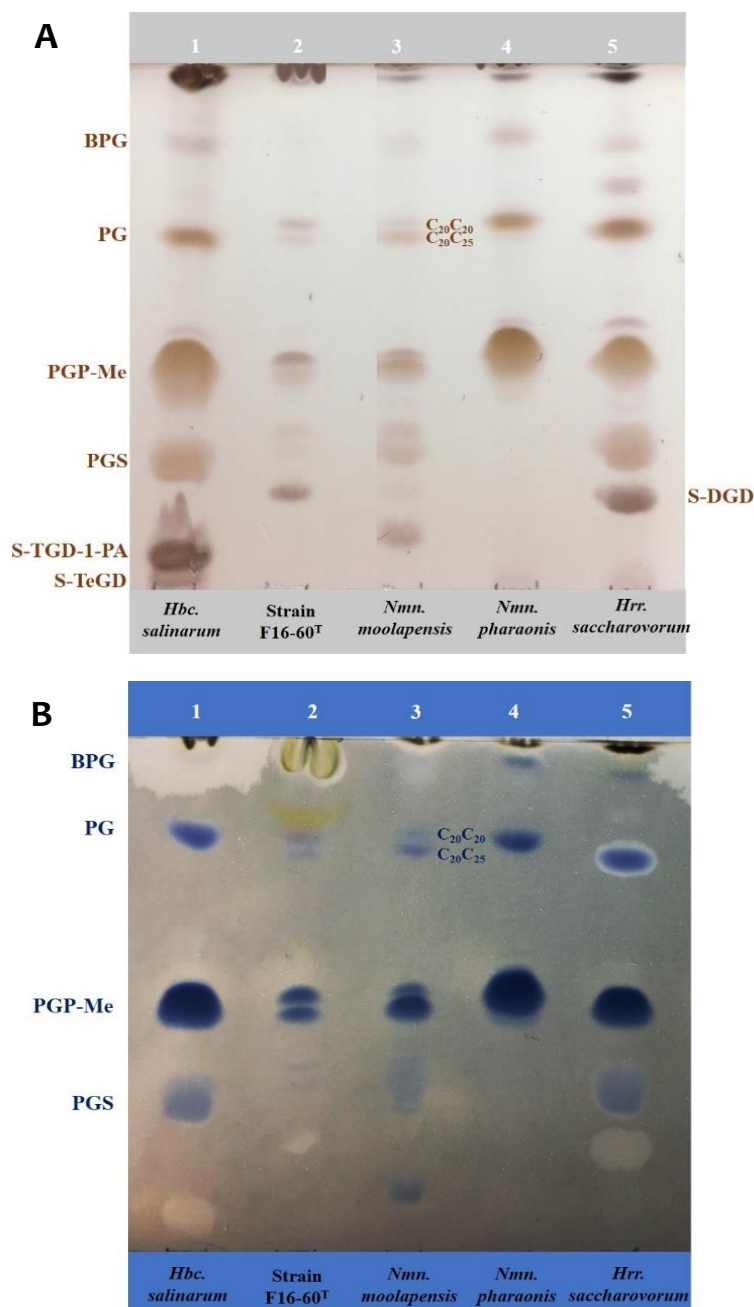


Figura 36. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F16-60^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con A) ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C y B) azul de molibdeno. Carriles: 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 2, Cepa F16-60^T; 3, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T; 4, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T; 5, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137^T.

Abreviaciones: BPG, bifosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PGP-Me, fosfatidilglicerol fosfato metil éster; PGS, fosfatidilglicerol sulfato; S-DGD-1, sulfato diglicosil diéter; S-TGD-1-PA, ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico; S-TeGD, sulfato tetraglicosil diéter.

En el caso concreto de las haloarqueas, el perfil lipídico constituye un marcador taxonómico muy útil, especialmente para la diferenciación a nivel de género (Oren *et al.*, 2009; Angelini *et al.*, 2012). Si comparamos el perfil lipídico de la cepa F16-60^T con el de las especies del género *Natronomonas*, cabe mencionar algunas diferencias encontradas, como la ausencia de bifosfatidilglicerol (BPG) y de ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico (S-TGD-1-PA), presentes en *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T y ausentes en la cepa F16-60^T, lo que reafirmaría la condición de ésta última como género diferente.

En lo referente a la caracterización fenotípica, las células de la cepa F16-60^T presentan una morfología irregular (0,6 x 3,0 µm) (Figura 37), son inmóviles y se tiñen como Gram-negativas. Las colonias presentan una pigmentación de color roja. Capaz de crecer en un estrecho rango salino (25 – 30 % [p/v] NaCl). No necesita Mg²⁺ para crecer. Catalasa y oxidasa negativas. Capaz de reducir los nitratos y los nitritos. Las pruebas de Voges-Proskauer, producción de indol, Citrato de Simmons y ureasa son negativas. Otras características fenotípicas, como los rangos y valores óptimos de crecimiento a distintos pH, temperatura y salinidad, las hidrólisis de diferentes compuestos y la utilización de carbohidratos y otros sustratos, se detallan en la descripción del género y especie y en la Tabla 21, en la que se muestran las características diferenciales de esta cepa y *Natronomonas moolapensis*.

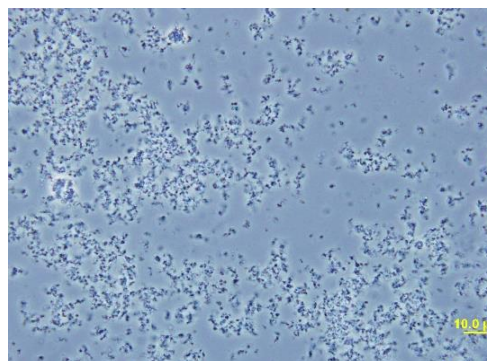


Figura 37. Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F16-60^T. Escala, 10 µm.

Tabla 21. Características diferenciales de la cepa F16-60^T y *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. **Cepas: 1,** Cepa F16-60^T; **2,** *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. Todos los datos son de este estudio, excepto los indicados con *, datos tomados de Burns *et al.*, (2010a). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo; ND, no determinado.

Características	1	2
Morfología	Irregular	Bacilo o pleomórfica*
Motilidad	-	+*
Tamaño celular (µm)	0,6 x 3,0	0,7 x 1,7*
Tamaño de la colonia (mm)	0,5	0,5-1,0*
Pigmentación	Roja	Rosa*
Rango NaCl (% p/v)	25-30	14-36*
NaCl óptimo (% p/v)	30	18-20*

Características	1	2
Rango temperatura (°C)	25-45	25-45*
Temperatura óptima(°C)	37	ND
Rango pH	6,5-9,0	5,5-8,5*
pH óptimo	7,5	7,0-7,5*
Reducción de nitritos	+	-
Prueba rojo de metilo	w	+
Hidrólisis de gelatina	+	-
Producción de ácidos:		
L-Citrulina	w	-
D-Fructosa	+	w
Glicerol	-	w
D-Xilosa	+	w
Utilización de ^a :		
D-Glucosa	+	-
D-Melobiosa	+	-
L-Rafinosa	+	-
Glicerol	-	+
L-Alanina	+	w
L-Cisteina	+	-
L-Glicina	-	+
L-Lisina	-	+
Isoleucina	-	+
Valina	-	+
Fumarato	-	+
Malato	-	+
Piruvato	+	-

*Como fuente de carbono y energía

IV.2.III.I. Descripción de *Haloglomus* gen. nov.

Haloglomus (Ha.lo.glo'mus. Gr. masc. n. *hals*, *halos* sal; L. neut. N. *glomus* globo; N.L. neut. N. *Haloglomus*, globo de sal).

Las células son bacilos curvados o irregulares, que se encuentran frecuentemente agrupados de forma desordenada. Las colonias presentan pigmentación roja. Halófilo extremo. Aerobio estricto. Catalasa y oxidasa negativas.

Los lípidos polares son fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1).

El contenido en G+C del ADN es de 68,0 moles% (genoma). El género *Haloglomus* pertenece a la familia *Haloarculaceae*, dentro del orden *Halobacteriales* y filogenéticamente relacionada con el género *Natronomonas* (con un porcentaje de semejanza $\leq 92,9$ % correspondiente al gen ARNr 16S). La especie tipo es *Haloglomus irregulare*. La abreviación recomendada para este género es *Hgl*.

IV.2.III.II. Descripción de *Haloglomus irregulare* sp. nov.

Haloglomus irregulare (ir.re.gu.lá're. L. neut. adj. *irregulare*, de forma no definida o no regular).

Las células son bacilos de forma curvada o irregular, que se encuentran frecuentemente agrupados de forma desordenada. Inmóviles, se tiñen como Gram-negativos, con un tamaño de 0,6 x 3,0 μm . Las colonias son circulares, de borde entero, de color rojo y presentan un diámetro de 0,5 mm en medio DBCM2, después de más de tres semanas de incubación a 37 °C. Halófilo extremo. Las células requieren para crecer un 25-30 % (p/v) de NaCl, con un óptimo al 30 %. No crece en ausencia de NaCl. Aerobio estricto. No es capaz de crecer en anaerobiosis en presencia de arginina, dimetilsulfóxido o nitrato potásico. Crece a 25-45 °C, con el óptimo a 37 °C, y a valores de pH entre 6,5-9,0, con el óptimo de crecimiento a pH 7,5. Catalasa y oxidasa negativas. Hidroliza la gelatina, pero no el ADN o el Tween 80. Reduce los nitratos y los nitritos. Produce ácidos a partir de arabinosa, celobiosa, citrulina, fructosa, ribosa y xilosa, pero no a partir de amigdalina, arbutina, dulcitol, galactosa, glicerol, glucosa, maltosa, manitol, manosa, melecitosa, rafinosa, sacarosa, sorbitol, trealosa o xilitol. No produce indol ni H₂S. Rojo de metilo débilmente positivo. Pruebas de Voges-Proskauer, ureasa y citrato de Simmons negativas. Los siguientes compuestos son utilizados como única fuente de carbono y energía: glucosa, melobiosa, rafinosa y piruvato. Los siguientes compuestos no son utilizados como única fuente de carbono y energía: arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, manosa, ribosa, sacarosa, trealosa, xilosa, melecitosa, salicina, butanol, dulcitol, etanol, glicerol, manitol, sorbitol, xilitol, metanol, benzoato, citrato, formato, fumarato, propionato, valerato, hipurato, malato o tartrato. Los siguientes compuestos son utilizados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía: alanina y cisteína. Mientras que arginina, glutamina, metionina, glicina, lisina, isoleucina y valina no son utilizados como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Los lípidos polares son fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a

sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1). El contenido en G+C del ADN es de 68,0 moles% (genoma).

La cepa tipo es F16-60^T (= CECT 9635^T = JCM 33318^T), aislada a partir de un estanque de las salinas de Isla Cristina, Huelva.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S y al gen *rpoB* de la especie *Haloglomus irregulare* F16-60^T, han sido depositadas en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ, bajo los números de acceso MH424600 y MK182272, respectivamente. El genoma de la misma también ha sido depositado allí con el número de acceso QMDX00000000.

IV.2.III.III. Ecología y abundancia del género *Haloglomus*

Para poder evaluar la distribución y abundancia global de la cepa F16-60^T, se llevaron a cabo estudios de reclutamiento genómico frente a diferentes bases de datos metagenómicas (datalladas en la Tabla 9 de Material y Métodos). Los resultados de dichos reclutamientos se muestran en la Figura 38 de Resultados y Discusión y en la Figura S1 del Anexo.

En la Figura 38 se han representado los reclutamientos del genoma de la cepa F16-60^T con respecto a metagenomas de dos ambientes hipersalinos diferentes, las salinas de Santa Pola (Alicante) y el lago Meyghan (Irán), de los cuales se han seleccionado tres bases de datos metagenómicas distintas ordenadas por gradiente de salinidad. Los resultados indican que en ambos hábitats la presencia de la cepa F16-60^T se incrementa con la salinidad, siendo la abundancia de la misma especialmente llamativa en los metagenomas al 19 y 37 % (p/v) de NaCl de las salinas de Santa Pola, y del 18 y 30 % de NaCl del lago Meyghan en Irán, lo que no es de extrañar dados los rangos de crecimiento salino recientemente mencionados en la descripción del taxón. Con estos datos podemos afirmar que la cepa F16-60^T es una verdadera arquea halófila extrema que prefiere habitar a salinidades altas.

Adicionalmente, aunque los datos obtenidos no indican que el género *Haloglomus* sea especialmente abundante en ninguna de las bases de datos estudiadas, sí que podemos afirmar que se encuentra ampliamente distribuido en otros ambientes hipersalinos, ya que se encuentra presente en diferentes localizaciones alejadas geográficamente: Australia, España, Irán o Rumania (Figura 38 de Resultados y Discusión y Figura S1 del Anexo). Por otro lado, la abundancia de *reads* por debajo del 95 % de semejanza frente a las bases de datos SS37, R, W y S7 (Figura 38 de Resultados y Discusión y Figura S1 del Anexo) también sugiere que puedan existir en estos hábitats, otras especies relacionadas con este género no aisladas hasta la fecha.

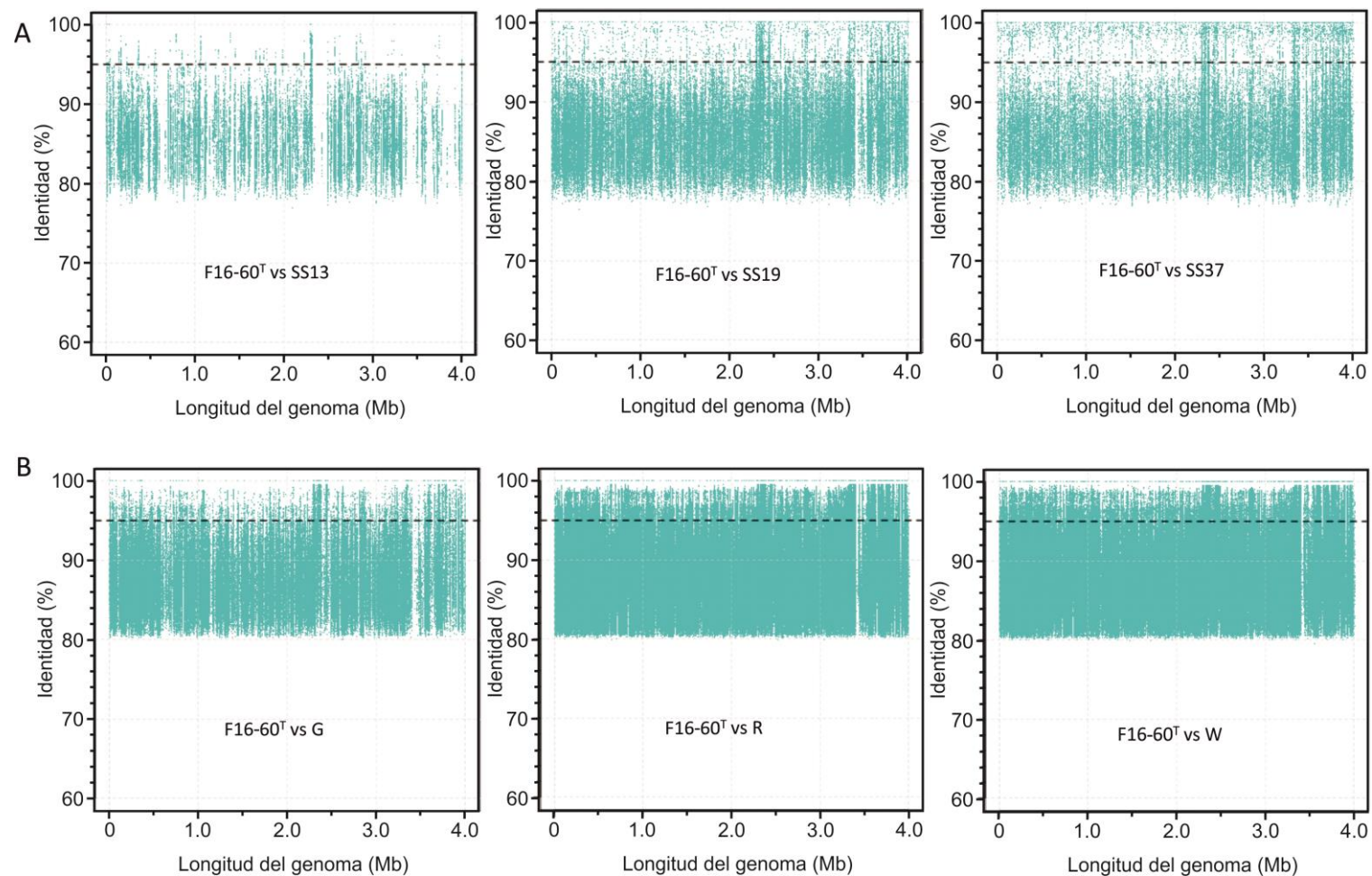


Figura 38. Reclutamiento genómico de la cepa F16-60^T frente a distintos metagenomas: **A)** SS13, SS19 y SS37 de las salinas de Santa Pola (Alicante), **B)** G, R y W del lago Meyghan (Irán). Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de read ≥ 30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie.

Abreviaciones: **G** - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 5 % salinidad, **R** - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 18 % salinidad, **W** - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 30 % salinidad, **SS13** - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 13 % salinidad, **SS19** - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 19 % salinidad, **SS37** - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 37 % salinidad.

IV.2.IV. Aislamiento, caracterización y análisis genómico de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13

IV.2.IV.I. Aislamiento, filogenia e índices de relatividad de los nuevos aislados

Como ya se ha mencionado anteriormente, el principal objetivo de este trabajo era el aislamiento de nuevos grupos microbianos abundantes en ambientes hipersalinos, que no habían conseguido aislarse previamente en cultivo puro. En un intento por continuar aislando algunos de estos grupos, conseguimos identificar cuatro cepas denominadas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, las cuales se encontraban filogenéticamente relacionadas con el género *Natronomonas*. En base a los bajos porcentajes de semejanza obtenidos a partir de la comparación de las secuencias casi completas del gen ARNr 16S y *rpoB*' (Tablas 22 y 23) de estas cepas, muy por debajo de los límites establecidos para la delineación de género (Busse *et al.*, 2010; Yarza *et al.*, 2014), así como en base a la posición filogenética resultante de las construcciones filogenéticas de ambos genes (Figuras 39), estas cepas se seleccionaron para llevar a cabo un estudio más detallado que incluyera un exhaustivo análisis genómico comparativo, así como su descripción taxonómica completa como posibles nuevos taxones.

Tabla 22. Especies filogenéticamente más cercanas a las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, en base a la comparación de secuencias del gen ARNr 16S.

Cepa	Longitud secuencia ARNr 16S (pb)	Especie más relacionada		
		<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T	<i>Natronomonas gomsonensis</i> SA3 ^T
F12-1 ^T	1400	93,1	93,0	92,4
F17-44 ^T	1401	93,1	92,9	92,3
F18-79	1400	93,4	93,2	92,5
F19-13	1407	92,8	92,6	92,3

Tabla 23. Especies filogenéticamente más cercanas a las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, en base a la comparación de secuencias del gen *rpoB*'.

Cepa	Longitud secuencia <i>rpoB</i> ' (pb)	Especie más relacionada		
		<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T	<i>Natronomonas gomsonensis</i> SA3 ^T
F12-1 ^T	601	84,1	84,9	83,9
F17-44 ^T	599	83,2	84,6	83,6
F18-79	623	83,2	84,6	83,6
F19-13	624	83,2	84,6	83,6

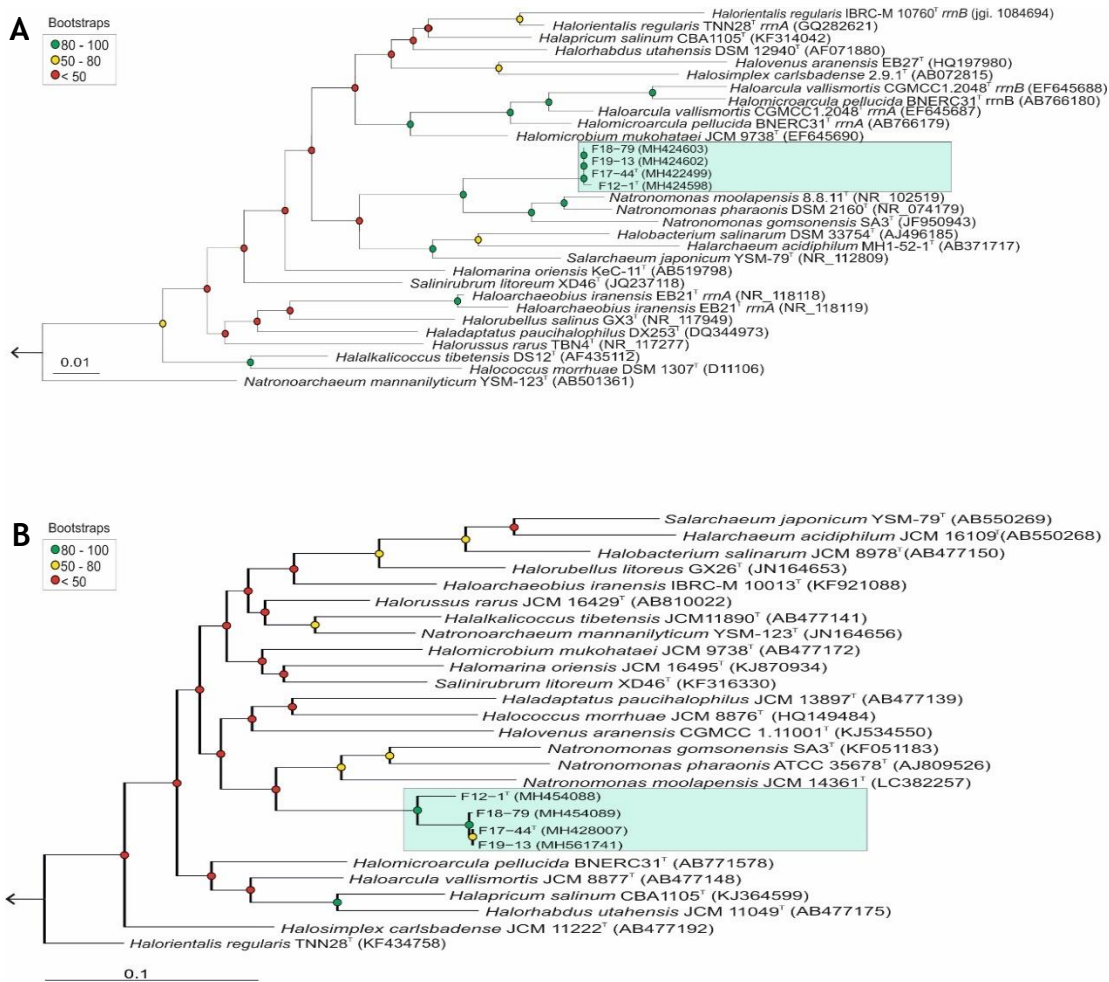


Figura 39. Árboles filogenéticos obtenidos por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen ARN_{16S} (A) y del gen *rpoB*⁺ (B) en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 y especies de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. Como *outgroup* se utilizaron *Candidatus Nanosalinarum* J07AB56 y *Candidatus Nanosalina* J07AB43. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Mientras que la cepa F12-1^T se aisló a partir de una muestra de agua de un estanque cristizador de las salinas de Isla Cristina (31 % [p/v] y pH 7,4), las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13 se aislaron a partir de muestras de agua de las salinas de Isla Bacuta (19, 27 y 19 % [p/v] NaCl y pH 7,8, 7,5 y 7,8, respectivamente).

En primer lugar, con el propósito de confirmar la posición filogenética exacta de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 se construyó un árbol filogenómico en base a la secuencia concatenada de 299 genes ortólogos, entre las cuatro cepas objeto de estudio y las especies tipo de los géneros descritos del orden *Halobacteriales* (Figura 40). Los

resultados de esta construcción filogenómica muestran claramente la ubicación de los nuevos aislados en una rama independiente, lo suficientemente alejada del género *Natronomonas* y de los demás géneros del orden *Halobacteriales* y respaldado por valores elevados de *bootstrap* (Figura 40). Asimismo, dentro de este grupo, las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13, se agrupan juntas y separadas de la cepa F12-1^T, también soportado por valores altos de *bootstrap*. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente a partir de los genes ARNr 16S y *rpoB*^T, y sugieren que pueda tratarse de un nuevo género con dos especies diferentes.

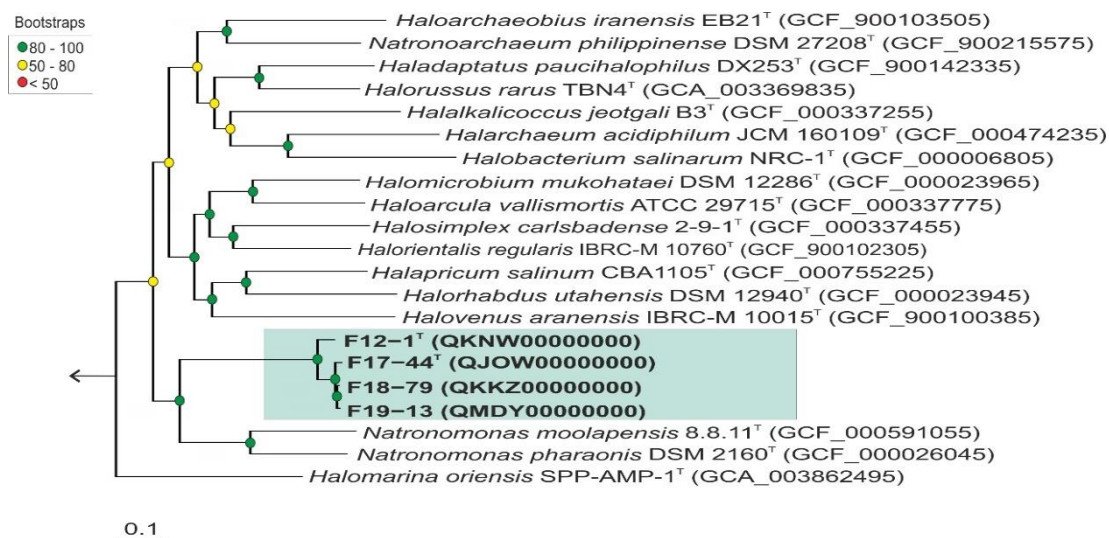


Figura 40. Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de 299 genes *core-orthologous*, en el que se muestran las relaciones filogenómicas entre las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 y las especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales*. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. Como *outgroup* se han utilizado *Candidatus Nanosalinarum* J07AB56 y *Candidatus Nanosalina* J07AB43. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en la actualidad, la definición más aceptada de género y especie procariota recae sobre la determinación de los parámetros: identidad aminoacídica media (AAI) (Konstantinidis et al., 2017), identidad nucleotídica media (ANI) (Konstantinidis & Tiedje, 2004; Richter & Rosselló-Móra, 2009b) e hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH) (Goebel & Stackebrandt, 1994; Klappenbach et al., 2007; Auch et al., 2010a). Los valores de AAI de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 con respecto a las especies filogenéticamente más relacionadas, *Natronomonas moolapensis* 8.8.11^T y *Natronomonas pharaonis* DSM 2160^T, fueron en todos los casos inferiores al 65 %, lo que

confirma su estatus de nuevo género procariota (Figura 41), mientras que, los valores obtenidos entre las cuatro cepas objeto de estudio fueron muy superiores a este valor de corte, lo que indica que las cuatro forman parte del mismo género (Figura 41). Por otro lado, los resultados del cálculo de ANI y de DDH entre la cepa F12-1^T y las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13 fueron en todos los casos inferiores al 95 % y al 70 %, respectivamente; al mismo tiempo que dichos porcentajes fueron superiores a estos valores entre las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13 (Figura 41 y Tabla 24), confirmando así que se trata de dos especies diferentes dentro del nuevo género. Además, en concordancia con estos datos, las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13 también mostraron un elevado nivel de sintenia entre ellas (Figura 42), mientras que por el contrario, atendiendo al mismo porcentaje de semejanza, el nivel de sintenia obtenido entre las cepas F12-1^T y la cepa F17-44^T es muy bajo, lo que apoyando a los porcentajes de semejanza obtenidos entre ellas, indicaría que se trata de dos taxones diferentes (Figura 42).

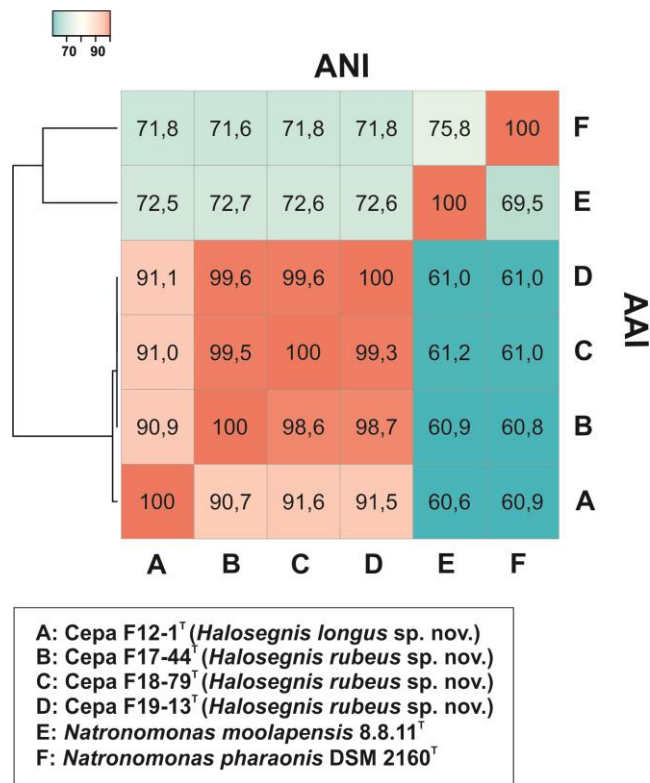


Figura 41. Agrupamientos jerárquicos entre los genomas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 y los genomas de las especies de *Natronomonas* filogenéticamente más cercanas. Los valores de ANI y AAI se muestran mediante mapas de calor, cuyos valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte superior de la imagen. La designación de las cepas y sus números de acceso se encuentran detallados en el panel inferior.

Tabla 24. Porcentajes de hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH) entre los nuevos aislados y los genomas de las cepas tipo de las especies de *Natronomonas*.

Cepas	1	2	3	4	5	6
(1) Cepa F12-1 ^T	-	43,6	43,4	43,4	20,2	19,3
(2) Cepa F17-44 ^T	-	-	97,2	97,9	21,0	19,3
(3) Cepa F18-79	-	-	-	97,4	20,7	19,5
(4) Cepa F19-13	-	-	-	-	20,6	19,5
(5) <i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 ^T	-	-	-	-	-	21,5
(6) <i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 ^T	-	-	-	-	-	-

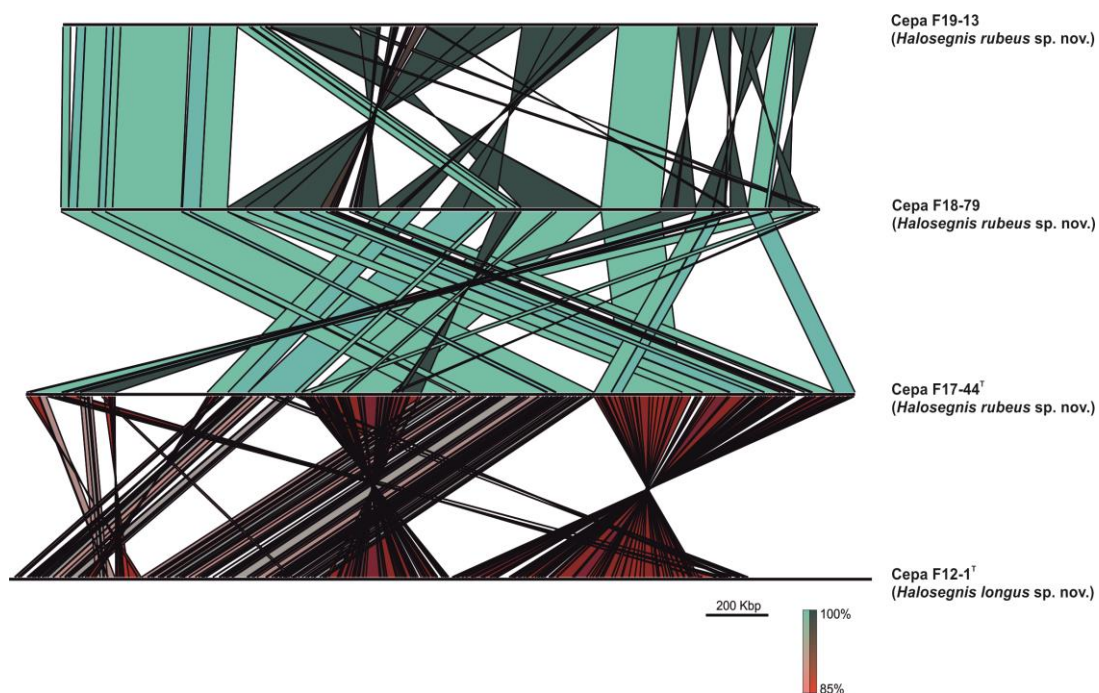


Figura 42. Alineamiento y comparación de los genomas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13. Comparación realizada con BLASTN con longitud de alineamiento de 50 pb y semejanza superior al 85 %. Los valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte inferior de la imagen.

IV.2.IV.II. Caracterización fenotípica y quimiotaxonómica

Para poder completar caracterización taxonómica de los nuevos aislados, se llevaron a cabo las caracterizaciones quimiotaxonómicas y fenotípicas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, de acuerdo a los estándares mínimos para la descripción de nuevos taxones del orden *Halobacteriales* (Oren et al., 1997). Para la caracterización quimiotaxonómica se utilizaron como referencia las especies filogenéticamente más cercanas *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T y *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T, además de *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T y *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137^T,

como patrones. Mientras que, para la caracterización fenotípica, debido al carácter alcalófilo de *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T, la cual es incapaz de crecer en el medio óptimo no alcalófilo de las cepas objeto de estudio, solo se incluyó *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T en la comparación.

En lo referente a la caracterización quimiotaxonómica, el análisis del perfil de lípidos polares de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, revela que los nuevos aislados poseen un perfil lipídico idéntico, caracterizado por la presencia de bifosfatidilglicerol (BPG), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS), un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato diglicosil diéter (S-DGD-1), ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico (S-TGD-1-PA) y sulfato tetraglicosil diéter (S-TeGD). También presentan otros glicolípidos no identificados como lípidos minoritarios. Como era de esperar, dada la condición de nuevo género, se observan claras diferencias si comparamos el perfil de las cuatro cepas aisladas y el de las especies del género *Natronomonas*, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T y *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T, en las cuales la ausencia de ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico (S-TGD-1-PA) y sulfato tetraglicosil diéter (S-TeGD), así como la mayoría de los glicolípidos minoritarios da como resultado un perfil lipídico completamente diferente (Figura 43).

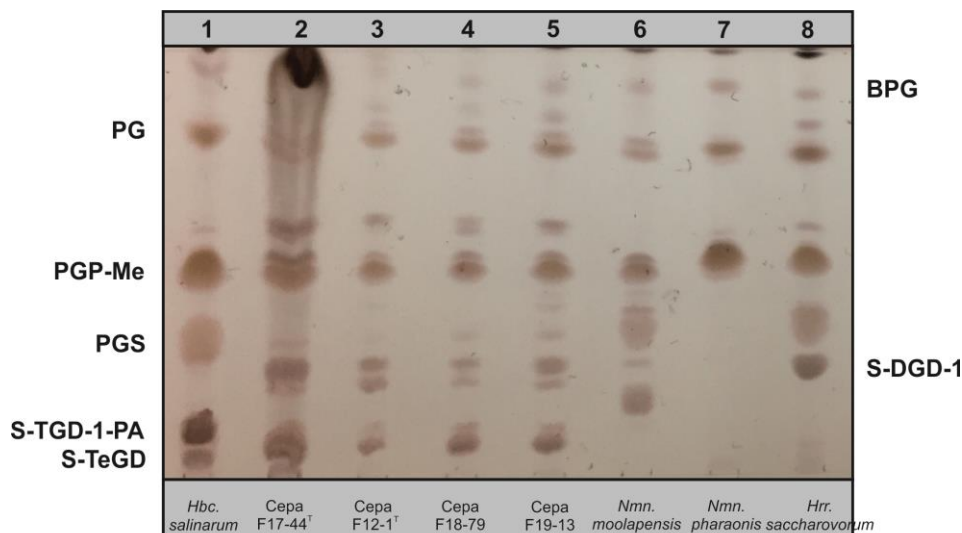


Figura 43. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79, F19-13 y otras especies de haloarqueas. La placa se reveló con ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C. Carriles: 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 2, Cepa F17-44^T; 3, Cepa F12-1^T; 4, Cepa F18-79; 5, Cepa F19-13; 6, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T; 7, *Natronomonas pharaonis* CECT 4578^T; 8, *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137^T.

Abreviaciones: BPG, bifosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PGP-Me, fosfatidilglicerol fosfato metil éster; PGS, fosfatidilglicerol sulfato; S-DGD-1, sulfato diglicosil diéter; S-TGD-1-PA, ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico; S-TeGD, sulfato tetraglicosil diéter.

Los resultados del estudio completo de las características fenotípicas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 se detallan en la descripción de cada especie y en la Tabla 25. Adicionalmente, las características diferenciales entre las cepas F12-1^T, F17-44^T y *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T se muestran en la Tabla 26.

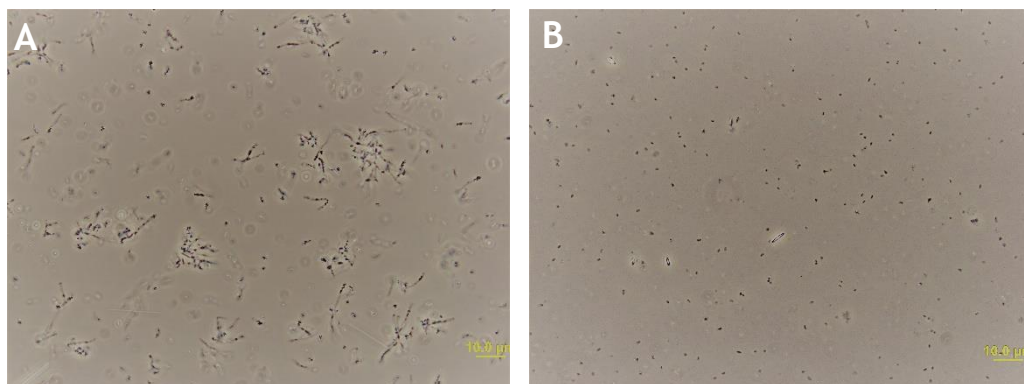


Figura 44. A) Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F12-1^T. B) Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F17-44^T. Escala, 10 µm.

Tabla 25. Características fenotípicas diferenciales entre las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13. **Cepas:** 1, cepa F12-1^T; 2, cepa F7-44^T; 3, cepa F18-79; 4, cepa F19-13. Todos los datos son de este estudio. +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.

Características	1	2	3	4
Tamaño celular (µm)	0,2-0,4 x 5-10	0,2-0,3 x 0,5-1,5	0,4-0,7 x 1-2	0,3-0,6 x 1-3
Pigmentación	Rojo claro	Rojo	Rojo	Rojo
Tamaño de la colonia (mm)	0,5	0,5	0,3	1
Rango NaCl (% p/v)	15-25	15-30	10-30	15-25
Óptimo NaCl (% p/v)	25	25	25-30	25
Rango temperatura (°C)	25-45	30-50	30-50	30-50
Temperatura óptima (°C)	37	37	37	37
Rango pH	6-8,5	6,5-8,5	7-8	6-7,5
Óptimo pH	7,5	7,5	7	7,5
Prueba rojo de metilo	w	-	-	+
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	+
Producción de ácidos:				
D-Amigdalina	-	-	w	-
D,L-Arabinosa	-	+	w	w
Arbutina	-	-	w	-
L-Citrulina	-	-	w	w
D-Fructosa	-	-	+	+
D-Glucosa	w	w	-	-
D-Manitol	-	-	+	-
Sorbitol	-	-	w	-

Características	1	2	3	4
Utilización de ^a :				
Fructosa	+	-	-	-
D-Galactosa	-	-	-	+
Maltosa	+	+	+	-
D-Melibiosa	-	-	+	+
L-Rafinosa	+	-	-	-
D-Melecitosa	-	+	-	-
Butanol	-	-	-	+
Dulcitol	-	-	+	+
Etanol	-	-	+	-
Glicerol	-	+	+	-
D-Manitol	-	+	+	-
D-Sorbitol	-	-	-	+
Metanol	-	+	-	+

^aComo fuente de carbono y energía

Tabla 26. Características que diferencian las cepas F12-1^T y F17-44^T de *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. **Cepas:** 1, F12-1^T; 2, F7-44^T; 3, *Natronomonas moolapensis* CECT 7526^T. Todos los datos son de este estudio, excepto los indicados con *, datos tomados de Burns et al., (2010a). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.

Características	1	2	3
Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos o pleomórfica*
Motilidad	-	-	+*
Tamaño celular (µm)	0,2-0,4 x 5-10	0,2-0,3 x 0,5-1,5	0,7 x 1,7*
Pigmentación	Rojo claro	Rojo	Rosa*
Tamaño de la colonia (mm)	0,5	0,5	0,5-1,0*
Rango NaCl (% p/v)	15-25	15-30	14-36*
Óptimo NaCl (% p/v)	25	25	18-20*
Rango temperatura (°C)	25-45	30-50	25-45*
Óptimo temperatura (°C)	37	37	ND
Rango pH	6-8,5	6,5-8,5	5,5-8,5*
Óptimo pH	7,5	7,5	7-7,5*
Catalasa	+	+	-
Reducción de nitratos	-	-	+
Prueba rojo de metilo	w	-	+
Utilización de ^a :			
Fructosa	+	-	-
Maltosa	+	+	-
L-Rafinosa	+	-	-
D-Melezitosa	-	+	-

Características	1	2	3
Glicerol	-	+	+
D-Manitol	-	+	-
Metanol	-	+	-

^aComo fuente de carbono y energía

A continuación se detallan las descripciones taxonómicas del nuevo género, *Halosegnis* gen. nov., y de las dos nuevas especies: *Halosegnis longus* sp. nov. y *Halosegnis rubeus* sp. nov., constituidas por la cepa F12-1^T, y por las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13, respectivamente.

IV.2.IV.III. Descripción de *Halosegnis* gen. nov.

Halosegnis (Ha.lo.seg'nis. Gr. masc. n. *hals*, halos sal; L. masc. adj. *segnis* lento; N.L. masc. n. *Halosegnis*, microorganismo halófilo de crecimiento lento)

Las células son bacilos inmóviles que se tiñen como Gram-negativos. Las colonias son de pigmentación roja a rosa. Aerobio estricto. Halófilo extremo. Catalasa positivo pero oxidasa negativo. Los lípidos polares mayoritarios son bifosfatidilglicerol (BPG), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS), un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato diglicosil diéter (S-DGD), ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico (S-TGD-1-PA) y sulfato tetraglicosil diéter (S-TeGD). También presenta otros glicolípidos no identificados como lípidos minoritarios. El contenido en G+C del ADN oscila entre 64,7 y 66,0 moles% (genoma).

La especie tipo es *Halosegnis rubeus*. Se encuentra dentro de la familia *Haloarculaceae* y del orden *Halobacteriales*. Filogenéticamente relacionado con el género *Natronomonas* (con un porcentaje de semejanza $\leq 93,4$ % correspondiente al gen ARNr 16S). La abreviación recomendada para este género es *Hsg*.

IV.2.IV.IV. Descripción de *Halosegnis longus* sp. nov.

Halosegnis longus (lon'gus. L. masc. adj. *longus*, largo)

Además de las mencionadas en la descripción del género, la especie muestra las siguientes características. Las células son bacilos, de tamaño entre 0,2-0,4 x 5-10 μm (Figura 44A). Las colonias son circulares, de borde entero, con una pigmentación rojo claro y con 0,5 mm de diámetro en medio R2A25, después de 15 días de incubación a 37 °C. Capaz de crecer en

presencia de 15-25 % (p/v) de NaCl, con un crecimiento óptimo al 20 % (p/v) de NaCl. Crece a temperaturas entre 25 y 45 °C y en valores de pH entre 6,0 y 8,5, con un crecimiento óptimo a 37 °C y pH 7,5. No se observa crecimiento en anaerobiosis en presencia de L-arginina, nitrato potásico y dimetilsulfóxido. No reduce los nitratos ni los nitritos. No hidroliza la gelatina, la esculina ni el almidón. La prueba del rojo de metilo es ligeramente positiva, pero no las de Voges-Proskauer, ureasa o citrato de Simmons. No produce indol. Produce ácidos a partir de D-glucosa y D-xilosa, pero no a partir de D-amigdalina, D,L-arabinosa, arbutina, L-citrulina, dulcitol, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, lactosa, D-maltosa, D-manitol, D-melecitosa, D-rafinosa, D-sacarosa, sorbitol, D-trealosa y L-xilitol. Utiliza fructosa, D-glucosa, D-maltosa, L-rafinosa y piruvato como única fuente de carbono y energía, pero no utiliza D-arabinosa, D-celobiosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, D-melibiosa, ribosa, sacarosa, D-trealosa, D-xilosa, D-melecitosa, salicina, butanol, dulcitol, etanol, glicerol, D-manitol, D-sorbitol, xilitol, metanol, benzoato, citrato, fumarato, valerato, hipurato y malato. Utiliza L-alanina, L-arginina, L-cisteína y valina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, pero no utiliza glutamina, L-metionina, L-glicina, L-lisina o isoleucina. El contenido en G+C es de 66,0 moles% (genoma).

La cepa tipo es F12-1^T (= CECT 9685^T = CCM 8889^T = IBRC-M 11246^T = JCM 33317^T), aislada a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Cristina, Huelva.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S y al gen *rpoB*' de la especie *Halosegnis longus* F12-1^T, se han depositado en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ, bajo los números de acceso MH424598 y MH454088, respectivamente. El genoma de la misma también se ha depositado allí con el número de acceso QKNW000000000.

IV.2.IV.V. Descripción de *Halosegnis rubeus* sp. nov.

Halosegnis rubeus (ru'be.us. L. masc. adj. *rubeus* rojo)

La especie muestra las siguientes características, además de las mencionadas en la descripción del género. Se trata de bacilos, con un tamaño de 0,2-0,7 x 0,5-3 µm (Figura 44B). Las colonias son circulares, de borde entero, de pigmentación roja a rosa, de diámetro entre 0,3-1 mm en medio R2A25, tras 15 días de incubación a 37 °C. El rango de crecimiento está comprendido entre 10-30 % de NaCl, pH 6,0-8,5 y 30-50 °C. Crece de forma óptima al 25 % NaCl, pH 7,5 y 37 °C. No se observa crecimiento en anaerobiosis en presencia de L-arginina, nitrato potásico y dimetilsulfóxido. No hidroliza la gelatina, esculina ni almidón. No reduce los nitratos ni los nitritos. No produce indol. Las pruebas de Voges-Proskauer, ureasa y citrato de Simmons son negativas. Rojo de metilo es también negativo

para la mayoría de las cepas. Todas las cepas producen ácidos a partir de D-xilosa y D,L-arabinosa, pero no a partir de glicerol, dulcitol, D-galactosa, lactosa, D-maltosa, D-melecitosa, D-rafinosa, sacarosa, D-trealosa y xilitol. Algunas cepas también producen ácidos a partir de L-citrulina, D-amigdalina, arbutina, D-fructosa, D-glucosa, D-manitol y sorbitol. Algunas cepas utilizan los siguientes compuestos como única fuente de carbono y energía: D-glucosa, maltosa, D-melecitosa, glicerol, D-manitol, D-melobiosa, butanol, D-sorbitol y metanol; sin embargo, ninguna utiliza: fructosa, L-rafinosa, piruvato, D-arabinosa, D-celobiosa, D-galactosa, lactosa, D-manosa, ribosa, sacarosa, D-trealosa, D-xilosa, salicina, dulcitol, etanol, xilitol, benzoato, citrato, fumarato, valerato, hipurato o malato. L-alanina, L-arginina, glutamina y L-lisina, son utilizados como fuente de carbono, nitrógeno y energía por algunas cepas, pero no L-cisteína, valina, L-metionina, L-glicina o isoleucina. El contenido en G+C oscila entre 64,7 y 65,1 moles% (genoma).

La cepa tipo es F17-44^T (= CECT 9385^T = CCM 8890^T = JCM 33319^T), aislada a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Bacuta, Huelva. El contenido en G+C del ADN de la cepa tipo es 65,1 moles% (genoma). Las cepas F18-79 y F19-13 son cepas adicionales de esta especie.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S y al gen *rpoB*' de la especie *Halosegnis rubeus* F17-44^T, han sido depositadas en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ, bajo los números de acceso MH422499 y MH428007, respectivamente. El genoma de la misma también se ha depositado allí con el número de acceso QJOW00000000.

IV.2.IV.VI. Características genómicas de los nuevos aislados

Con el fin de profundizar en este nuevo grupo y obtener la máxima información posible sobre su evolución, ecología y plasticidad metabólica, los genomas de los cuatro aislados se compararon con los genomas disponibles de las especies tipo de los géneros del orden *Halobacteriales* y se llevó a cabo un completo análisis genómico comparativo cuyos resultados se detallan a continuación.

En primer lugar, en la Tabla 27 se detallan las características de los genomas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13. El tamaño de estos genomas oscila entre 2,4 y 2,5 Mb, mientras que el contenido en G+C del ADN entre 64,7 y 66,0 moles%. Por un lado, llama la atención el tamaño tan pequeño de estos genomas en comparación con el de las especies tipo de otros géneros del orden *Halobacteriales*, cuya media es 3,5 Mb, y solo el genoma de *Halobacterium salinarum* NRC-1^T (2,1 Mb) posee un tamaño inferior al de estas nuevas

cepas. El contenido en G+C, sin embargo, sí se encuentra dentro del rango descrito para este orden. Asimismo, el contenido en genes codificantes de proteínas (CDS) varía entre 2595 y 2977, mientras que el de ARNts se encuentra entre 44 y 46. Por otro lado, sorprendentemente y a diferencia de la mayoría de las haloarqueas, estas cepas poseen un único operón ribosómico. La presencia de un único operón así como un tamaño genómico pequeño ha sido ya descrito para otros microorganismos de difícil crecimiento, como por ejemplo, *Spiribacter salinus* (López-Pérez et al., 2013; León et al., 2014) lo que podría estar relacionado con su adaptación a determinados medios ambientes.

Tabla 27. Características generales de los genomas de los cuatro aislados.

Característica	Cepa F12-1 ^T	Cepa F17-44 ^T	Cepa F18-79	Cepa F19-13
Tamaño (Mb)	2,5	2,4	2,4	2,4
Nº de contigs	1	10	10	16
Compleitud (%)	99,6	99,5	99,5	99,5
G+C (moles%)	66,0	65,1	64,7	64,8
N50 (pb)	2451061	553928	520506	373060
Nº de CDS	2977	2808	2595	2607
Nº de ARNr	3	3	3	3
Nº de ARNt	45	46	44	44
Números de acceso	QKNW00000000	QJOW00000000	QKKZ00000000	QMDY00000000

Para poder llevar a cabo una comparación más detallada de las características genómicas de los miembros de este nuevo taxón, se han representado gráficos circulares de sus respectivos genomas (Figura 45). Dichas representaciones muestran varias islas genómicas en cuanto al contenido en GC de todos estos genomas (Figura 45A-D). Asimismo, la representación genómica de la cepa F12-1^T, inicialmente ensamblada en 3 contigs, indica que este genoma se encuentra constituido por un único cromosoma (2,5 Mb) y por dos plásmidos, de tamaños 0,2 y 0,1 Mb, respectivamente. La presencia de sendos plásmidos viene respaldado por la clara evidencia de picos de bajos contenido en GC observados en los contigs 2 y 3 (Figura 45A), en comparación con el contenido en GC obtenido para el contig 1 y para los otros tres genomas. Además, tampoco se observa ninguna evidencia sinténica entre estos dos contigs y el genoma de la cepa F17-44^T (Figura 42). Otros datos genómicos, como el contenido en proteínas hipotéticas en cada contig: 27, 60 y 88 % en los contigs 1, 2 y 3, respectivamente, también apoyan este hecho. Del mismo modo, los contigs 5 y 6 correspondientes al genoma de la cepa F17-44^T muestran un comportamiento similar a esos dos contigs, claros picos de contenido en GC bajo, así como la ausencia completa de sintenia (Figuras 42 y 45B), incluso teniendo en

cuenta el elevado nivel de semejanza genómica entre las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13 (Figura 41 y Tabla 24). Todos estos datos también indican la presencia de un único cromosoma (2,4 Mb) y de dos plásmidos (1,7 y 1,3 Mb) en el genoma de la cepa F17-44^T.

Por otro lado, se han estudiado los orígenes de replicación del ADN en los cuatro genomas secuenciados. Las arqueas pueden presentar uno o varios orígenes de replicación, cuya estructura del sistema iniciador de la replicación, generalmente se encuentra conservada en todo el dominio. Esta estructura se caracteriza por presentar un gen iniciador, denominado *cdc6*, una zona con alto contenido en residuos de adenina y timina y varias repeticiones de motivos conservados (ORBs) (Leonard & Mechali, 2013; Wu *et al.*, 2014). Con respecto a la estimación del parámetro GC skew, las cepas F12-1^T y F18-79 claramente muestra un patrón bimodal a lo largo de los dos genomas con un único pico alrededor de 1,13 y 0,7 Mb, respectivamente (Figuras 45A y 45C), además de la presencia de dos genes *cdc6* en estos dos genomas, así como, la de dos secuencias de reconocimiento del origen de replicación (ORBs) (detalladas en la Tabla S1 del Anexo) adyacentes a sendos picos (Figuras 45E y 45F), apoyando así la hipótesis de la existencia de un único origen de replicación en ambos genomas. Por otro lado, la comparación de los *clusters* correspondientes al origen de replicación de las cepas F12-1^T y F18-79 resultó prácticamente idéntica (Figuras 45E y 45F).

De igual modo, durante el exhaustivo estudio de las características de estos genomas se ha puesto de manifiesto que la cepa F12-1^T, también posee un sistema CRISPR-cas completo con proteínas *cas* de tipo IB y 34 espaciadores, mientras que por el contrario, las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13 también presentan secuencias CRISPR aunque carecen de genes *cas*, lo que sugeriría su falta de funcionalidad. Asimismo, en el contig 3 del genoma de la cepa F12-1^T, también se ha identificado una secuencia correspondiente a un profago, de 15,1 kb de tamaño y una completitud de 30 (según PHASTER), y sin embargo, ninguna otra secuencia vírica ha sido identificada en los otros genomas, mostrando una vez más diferencias entre ambas especies.

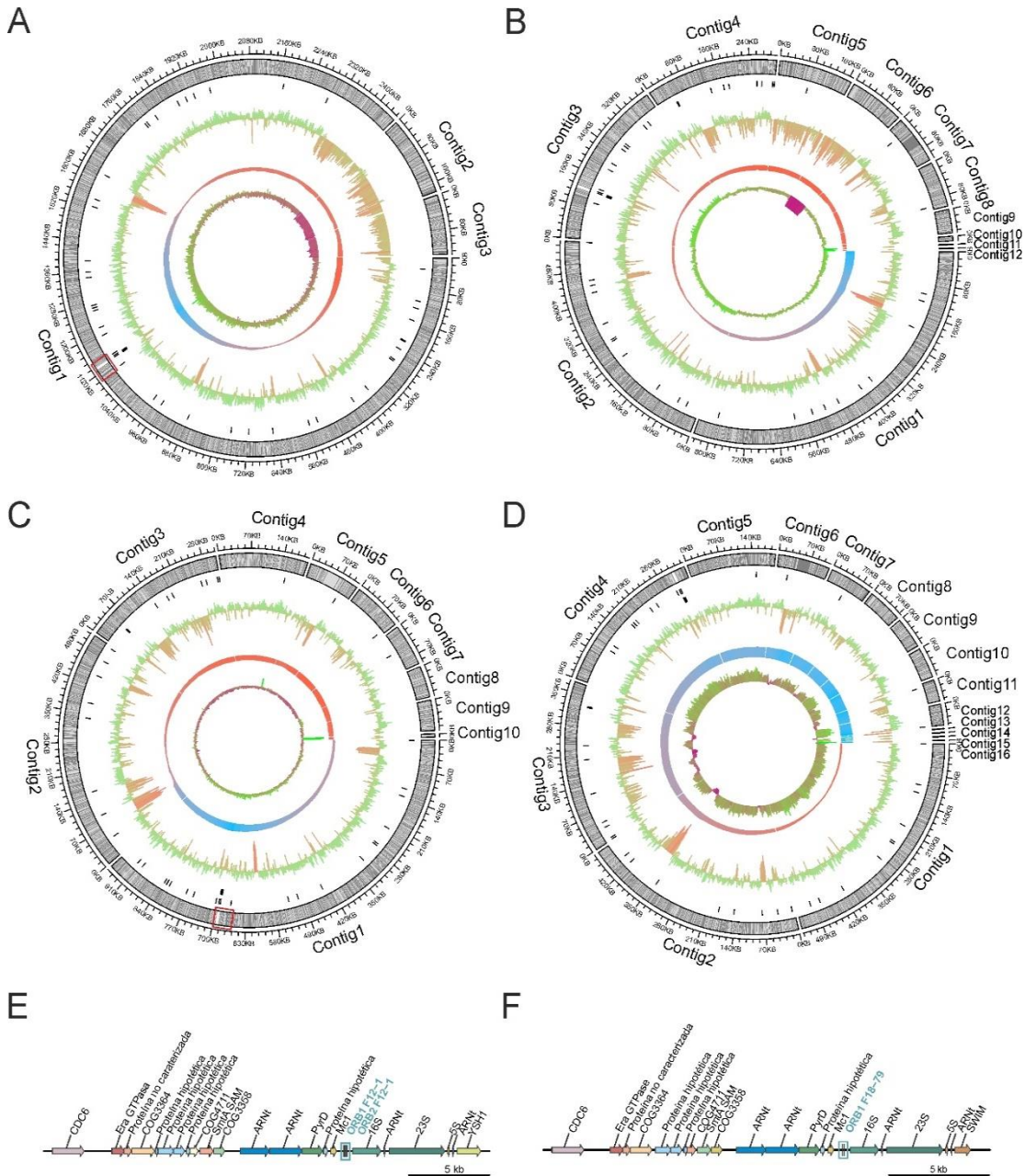


Figura 45. Representaciones circulares de los genomas de las cepas **A)** F12-1^T, **B)** F17-44^T, **C)** F18-79 y **D)** F19-13. Desde el exterior hacia el interior: representación de los contigs donde los números reflejan el tamaño en kb, en la segunda fila en negro se representan los ARNt y en la tercera los ARNr, contenido en G+C (verde claro, valores por encima de la media; salmón, los valores por debajo de la media), GC skew (azul, valores por encima de la media; rojo, los valores por debajo de la media), *coverage* (verde, valores por encima de la media; violeta, los valores por debajo de la media). Para el contenido en G+C, GC skew y el *coverage* se ha utilizado fragmentos de 1000 pb. Los cuadrados en rojo señalan los cluster de genes amplificados en las figuras **E)** cepa F12-1^T y **F)** cepa F18-79.

IV.2.IV.VII. Ecología y distribución del género *Halosegnis*

Para evaluar la importancia ecológica de este nuevo grupo en los ambientes hipersalinos, se determinó la abundancia de secuencias basada en el gen ARNr 16S en un total de 18 hábitats hipersalinos acuáticos de diferente distribución geográfica y porcentaje de salinidad. Igualmente, también se realizaron reclutamientos genómicos de cada cepa en concreto frente a las mismas bases de datos metagenómicas empleadas.

En lo que concierne a la abundancia de secuencias del gen ARNr 16S, los representantes del género *Halosegnis* se encontraron presentes en muchos de los metagenomas estudiados, especialmente en sistemas de salinidades intermedias, entre el 18 y el 27 % de NaCl, donde constituyen hasta un 8 % de la comunidad procariota en las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.) (27 % NaCl), y hasta un 4 % en las salinas de Isla Cristina (21 % NaCl) o en el lago Meyghan (Irán) (18 % NaCl) (Figura 46), donde representan el tercer y cuarto género más abundante, solo detrás de otros conocidos géneros como *Halorubrum*, *Haloquadratum* y *Halonotius* (Ghai et al., 2011a; Fernández et al., 2014; Durán-Viseras, et al., 2019b). Por tanto, según estos resultados, se estima que las especies del género *Halosegnis* conforman una proporción importante de los microorganismos que habitan en los ambientes hipersalinos y que además se encuentran ampliamente distribuidos en los mismos, ya que se han identificado en tres continentes diferentes (América, Asia y Europa) de los cuatro estudiados (Figura 46). No obstante, cabe destacar que este nuevo género haya sido identificado en el metagenoma procedente de la muestra al 5 % del lago Meyghan (Irán) (Figura 46), sugiriendo así, que en este ambiente concreto existan otros parámetros independientes de la salinidad que favorezcan su crecimiento.

En cuanto a los reclutamientos genómicos, se obtuvieron resultados similares para las cepas F17-44^T, F18-79 y F19-13, por lo que únicamente se muestran los correspondientes a las cepas tipo de cada especie: cepas F12-1^T y F17-44^T (Figura 47 y Figuras S2 y S3, del Anexo). Los reclutamientos más significativos se exhiben en la Figura 47, mientras que ambos genomas claramente dominan el metagenoma del lago Meyghan (18 % de salinidad), la cepa F17-44^T prevalece en Isla Cristina (21 % salinidad), Santa Pola (19 % salinidad) y Chula Vista (27 % salinidad) frente a la cepa F12-1^T, tal y como refleja el número de fragmentos reclutados entre el 95 y el 100 % de identidad en dichos ambientes (Figura 47). Cabe destacar que, a pesar de que la cepa F12-1^T se aislara de las salinas de Isla Cristina, su abundancia en este ambiente es menor que la obtenida para la cepa F17-44^T, aislada de las salinas de Isla Bacuta.

El resto de reclutamientos genómicos, se muestran en las Figuras S2 y S3 del Anexo. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de la abundancia de secuencias del gen ARNr 16S en el metagenoma ChVhigh4 (salinas de Chula Vista, EE.UU.), se hubiera esperado obtener reclutamientos metagenómicos significativos en este ambiente por parte de las cepas estudiadas; sin embargo, sorprendentemente, esto no ocurre, lo que sugiere que puedan existir otras especies relacionadas con este género aún por aislar.

Todos estos datos indican que, tal y como nos habíamos propuesto en esta Tesis Doctoral, se han conseguido aislar en cultivo puro algunos de los microorganismos hasta la fecha desconocidos, que han resultado ser abundantes en diversos ambientes hipersalinos, en este caso concretamente en hábitats con salinidades intermedias.

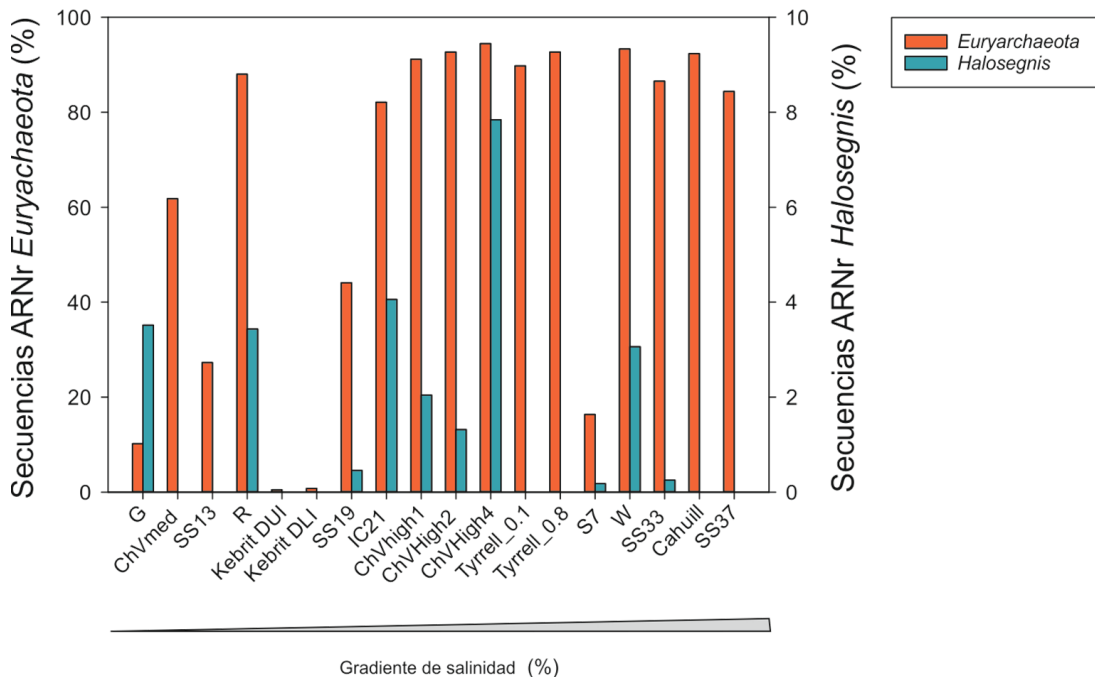


Figura 46. Porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas con *Euryarchaeota* y *Halosegnis*. Los metagenomas aparecen ordenados por gradiente de salinidad. **Abreviaciones:** G - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 5 % salinidad, ChVmed- Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 12 % salinidad, SS13 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 13 % salinidad, R - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 18 % salinidad, Kebrit-DUI - Metagenoma del Mar Rojo, 18,2 % salinidad, Kebrit-DLI - Metagenoma del Mar Rojo, 18,2 % salinidad, SS19 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 19 % salinidad, IC21 - Metagenoma de las salinas de Isla Cristina (Huelva), 21 % salinidad, ChVhigh1 - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad, ChVhigh2 - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad, ChVhigh4 - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad, Tyrrell 0.1 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, Tyrrell 0.8 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, S7 - Metagenoma del lago Fara Fund (Rumania), 30 % salinidad, SS33 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 33 % salinidad, Cahuill - Metagenoma de la laguna Cahuil (Chile), 34 % salinidad, SS37 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 37 % salinidad.

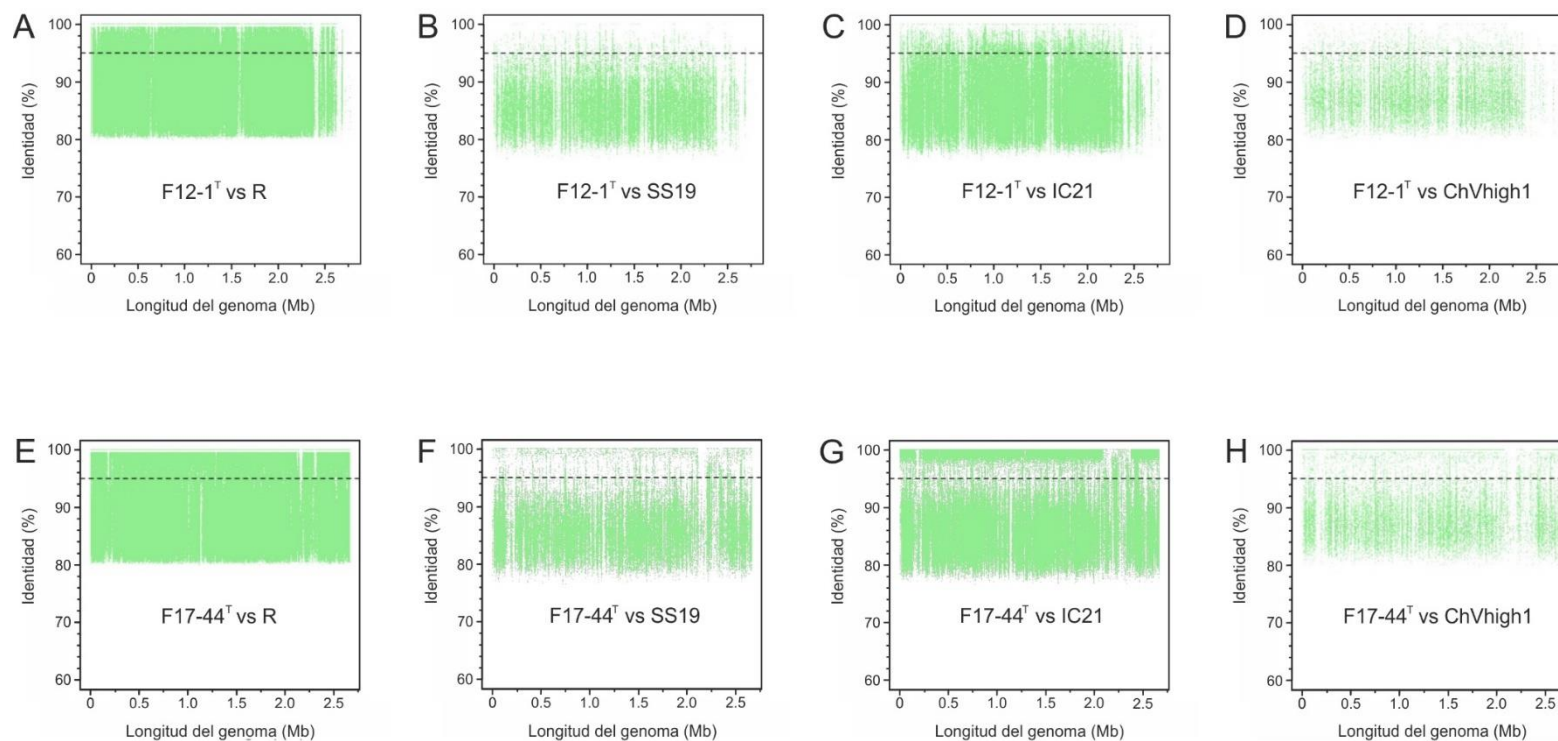


Figura 47. A-D) Reclutamiento genómico de la cepa F12-1^T frente a distintos metagenomas, E-H) Reclutamiento genómico de la cepa F17-44^T frente a distintos metagenomas. Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de *read* ≥ 30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie.

Abreviaciones: R - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 18 % salinidad, SS19 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 19 % salinidad, IC21 - Metagenoma de las salinas de Isla Cristina (Huelva), 21 % salinidad, ChVhigh1 - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad.

IV.2.IV.VIII. Metabolismo de las especies del género *Halosegnis*

En lo referente al estudio del metabolismo de los representantes de este nuevo género microbiano, se ha determinado que presentan un estilo de vida heterotrófico, tal y como demuestra el elevado número de transportadores para la captación de carbohidratos, tanto de tipo ABC como de otros tipos (Figura 48). No se han encontrado evidencias de capacidades fotosintéticas ni quimiolitotróficas, ni tampoco rutas para la fijación de carbono.

Por otro lado, se ha descrito que la mayoría de los miembros del dominio *Archaea* carecen de las “clásicas” rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos, presentando frecuentemente modificaciones de las mismas (Bräsen *et al.*, 2014). En lo que respecta a los miembros del género *Halosegnis*, sí se han encontrado todos los genes esenciales implicados en algunas de las rutas básicas del metabolismo del carbono, como la gluconeogénesis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o el del glicoxilato (Figura 48); sin embargo, en lo relativo a la glicólisis y más concretamente a la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EM), aunque la segunda parte de la ruta, denominada “de tres átomos de carbono” (desde gliceraldehído-3-fosfato a piruvato), sí está completa, algunos de los genes implicados en la primera parte, denominada parte de las “hexosas” (desde glucosa a gliceraldehído-3-fosfato) se encuentran ausentes (Figura 48). La carencia de esta parte de la ruta en haloarqueas, ha sido previamente descrita por Anderson *et al.*, (2011) y por Falb *et al.*, (2008). Otros estudios sugieren el uso de otras rutas alternativas, como la de Entner-Doudoroff (ED) o la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (PP) (Verhees *et al.*, 2003). Mientras que la mayoría de las haloarqueas disponen de la ruta de Entner-Doudoroff (ED), no se han encontrado en los genomas de *Halosegnis* ninguno de los genes implicados en la misma, del mismo modo que ocurre en *Natronomonas pharaonis* (Falb *et al.*, 2005). Por el contrario, las especies del género *Halosegnis* si presentan los genes codificantes de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato en haloarqueas, lo que sugiere que esta sea la ruta que utilicen como alternativa.

En relación con el metabolismo del nitrógeno, ninguno de los genomas de los cuatro nuevos aislados poseen los genes relacionados con la maquinaria enzimática necesaria para llevar a cabo la reducción secuencial de nitrato a amonio (nitrato y nitrito reductasas), pero sí se han encontrado los genes relacionados con la asimilación del amonio mediante la formación de glutamato, glutamina sintetasa y glutamato sintasa, además del gen codificante del transportador *Amt*, implicado en el transporte de amonio/amoniaco. Asimismo, se han encontrado genes codificantes de otros transportadores de compuestos que pueden servir como posible fuente de nitrógeno

(putrescina/espermidina, aminoácidos de cadena ramificada y nitrato-nitrito/taurina) (Figura 48). Se han identificado además, las rutas completas para la síntesis de diversos aminoácidos como treonina, cisteína, valina, isoleucina, lisina, arginina e histidina. Por otra parte, también se encuentran presentes las enzimas implicadas en el ciclo de la urea para la conversión de ornitina a arginina, aunque sin embargo, no lo están las que participan en la hidrólisis de urea a amonio.

Para nuestra sorpresa, en los genomas de los cuatro aislados se han encontrado el conjunto de genes codificantes de la ruta completa para la síntesis de ácido γ -aminobutírico (GABA) (Figura 48). El GABA es un aminoácido no proteico que se encuentra ampliamente distribuido en eucariotas y bacterias, en los cuales puede servir como fuente de carbono y energía (Kumar & Punekar, 1997; Shelp *et al.*, 1999). La ausencia de transportadores y de rutas catabólicas relacionadas con este compuesto en los genomas de las especies de *Halosegnis*, sugiere que éste pueda desempeñar algún papel dentro de la célula. En algunas bacterias, el GABA está implicado en la resistencia a ácidos o a estrés (Coleman *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2013), mientras que otros estudios llevados a cabo en arqueas y bacterias reflejan su potencial en el ámbito alimentario, nutricional o farmacéutico (Park & Oh, 2007; Siragusa *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013). La síntesis probable de este compuesto por los miembros del género *Halosegnis*, sugiere así su posible potencial en aplicaciones biotecnológicas. Hasta donde sabemos, no se ha descrito hasta la fecha ninguna otra arquea ni haloarquea capaz de sintetizar GABA utilizando esta ruta enzimática, por lo que no está clara la función que este aminoácido pueda ejercer en los nuevos taxones descritos.

Adicionalmente, se han encontrado en los genomas de las especies de *Halosegnis* los genes que codifican transportadores para la captación de fosfato y fosfonato, así como varios transportadores *mfs* de compuestos antimicrobianos y tóxicos (Figura 48). Estudios genómicos recientes en otro grupo de haloarqueas abundantes en ambientes hipersalinos (Durán-Viseras *et al.*, 2019b), han puesto de manifiesto la presencia de la ruta completa para la síntesis de cobalamina en las especies del género *Halonotius*, aunque no se han encontrado ninguno de los genes implicados en esta ruta en los genomas de *Halosegnis*. Tampoco se han detectado genes relacionados con la síntesis de arqueolos ni de ningún otro sistema que permita el movimiento celular.

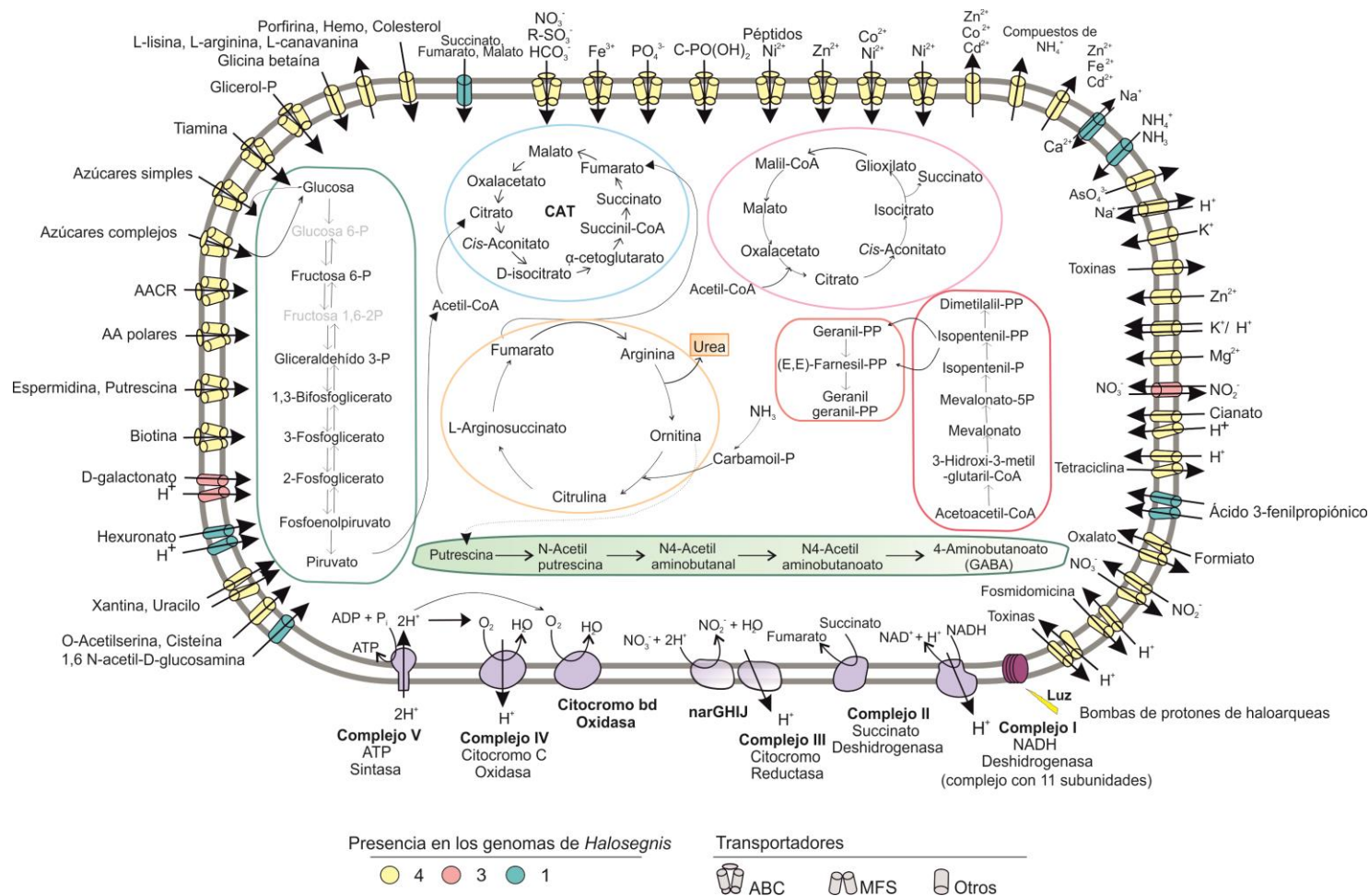


Figura 48. Reconstrucción metabólica del género *Halosegnis*. El recuadro verde hace referencia a la ruta de glicolisis “Embden-Meyerhof-Parnas”, el azul a la de los ácidos tricarboxílicos (CAT), el rosa a la síntesis de isoprenoides: C5 (rosa oscuro) y C10-C20 (rosa claro). El recuadro violeta corresponde al ciclo del glioxilato y el naranja al de la urea. Por último, el panel verde hace referencia a la ruta biosintética de 4-aminobutanoato (GABA). El color gris se ha utilizado para marcar los genes ausentes en los genomas estudiados.

Abreviaciones: AACR-aminoácidos de cadena ramificada, HMP-hidroximetilpirimidina, CAT, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

IV.2.IV.IX. Osmorregulación

Como ya se ha mencionado anteriormente, los microorganismos halófilos han desarrollado diversas adaptaciones fisiológicas a los ambientes hipersalinos y a los cambios de salinidad en los mismos, las cuales se ponen de manifiesto a través de algunos parámetros genómicos entre los que se encuentran la disposición de un proteoma ácido y en general, un alto contenido en G+C.

En función del mecanismo de osmorregulación empleado, las estrategias de los microorganismos halófilos se clasifican en *salt-in* o *salt-out* (Galinski & Trüper, 1994; Wood *et al.*, 2001). Los microorganismos con estrategia *salt-in* consiguen el balance osmótico a partir de la acumulación en el citoplasma de una fracción importante de iones inorgánicos. Para poder mantener la solubilidad de las proteínas y asegurar la funcionalidad de la célula, el proteoma de estos microorganismos requiere cambios compensatorios para la adaptación del citoplasma a la elevada fuerza iónica existente en el mismo (Oren, 2013; Saum *et al.*, 2013; Talon *et al.*, 2014; Warden *et al.*, 2015), lo que conduce a un proteoma ácido en el que la superficie hidrofóbica se encuentra muy reducida.

Se ha realizado un análisis del proteoma de los cuatro aislados con respecto al de otros microorganismos con estrategia *salt-in*, como la arquea halófila *Haloquadratum walsbyi* HBSQ00 (Bolhuis *et al.*, 2006), la bacteria halófila *Salinibacter ruber* DSM 13855^T (Mongodin *et al.*, 2005); y con el de una bacteria halófila con estrategia *salt-out*, *Spiribacter salinus* M19-40^T (López-Pérez *et al.*, 2013) (Figura 49A). Los resultados indican que las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 presentan un único pico de punto isoeléctrico alrededor de 4,0, al igual que *Haloquadratum walsbyi* y *Salinibacter ruber* (Figura 49A), siguiendo así el patrón de aminoácidos característico de ambientes hipersalinos, con una preferencia hacia el uso de residuos ácidos.

Del mismo modo, se calculó la frecuencia de aminoácidos para las cuatro cepas objeto de estudio (F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13) y para las mismas especies de referencia. La representación gráfica de los mismos muestra una predominancia de aminoácidos ácidos (aspartato y glutamato) frente a los básicos (arginina o lisina) por parte de las cepas F12-1^T,

F17-44^T, F18-79 y F19-13 (Figura 49B), rasgo también compartido con la mayoría de los microorganismos con estrategia *salt-in* (Lanyi, 1974; Kastitis et al., 2007; Paul et al., 2008; Elevi Bardavid & Oren, 2012), y por tanto sugiriendo el uso de esta estrategia por parte de las especies del género *Halosegnis*.

Asimismo, otra alternativa para definir la respuesta osmótica de un microorganismo es midiendo la concentración intracelular de iones (Gunde-Cimerman et al., 2018). Los microorganismos con estrategia *salt-in* se caracterizan por acumular grandes cantidades de iones K⁺ o Cl⁻ en el interior celular, mientras que el ión Na⁺ es exportado en la medida de lo posible al exterior (Oren, 2011; Gunde-Cimerman et al., 2018). En relación con esta propiedad, en los genomas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13 se han encontrado varios transportadores secundarios que contribuyen a la traslocación de estos solutos a través de la membrana, empleando para ello un gradiente electroquímico (Figura 48). Los canales de K⁺ y los simportadores de K⁺/H⁺, permiten la entrada de K⁺ en la célula, mientras que los sistemas antiportadores de Na⁺/H⁺ y Na⁺/Ca²⁺ excluyen el Na⁺ del citoplasma (Figura 48), lo que se encuentra en concordancia con el mecanismo de adaptación de tipo *salt-in*.

Los microorganismos con estrategia *salt-out* por su parte, compensan la alta salinidad del medio externo expulsando estos iones al exterior y acumulando en cambio, diferentes compuestos orgánicos denominados solutos compatibles. En el caso de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, se ha encontrado presente un transportador de tipo BCCT para la captación de glicina-betaína (*betL*) (Figura 48). Según el estudio de Anderson et al., (2011), este transportador se encuentra ampliamente distribuido entre los miembros de la clase *Halobacteria*. Por el contrario, no se ha encontrado ningún otro transportador de solutos compatibles ni ninguna ruta de biosíntesis de estos compuestos en los genomas de los nuevos aislados, indicando así, que los miembros del género *Halosegnis* no utilizan esta estrategia.

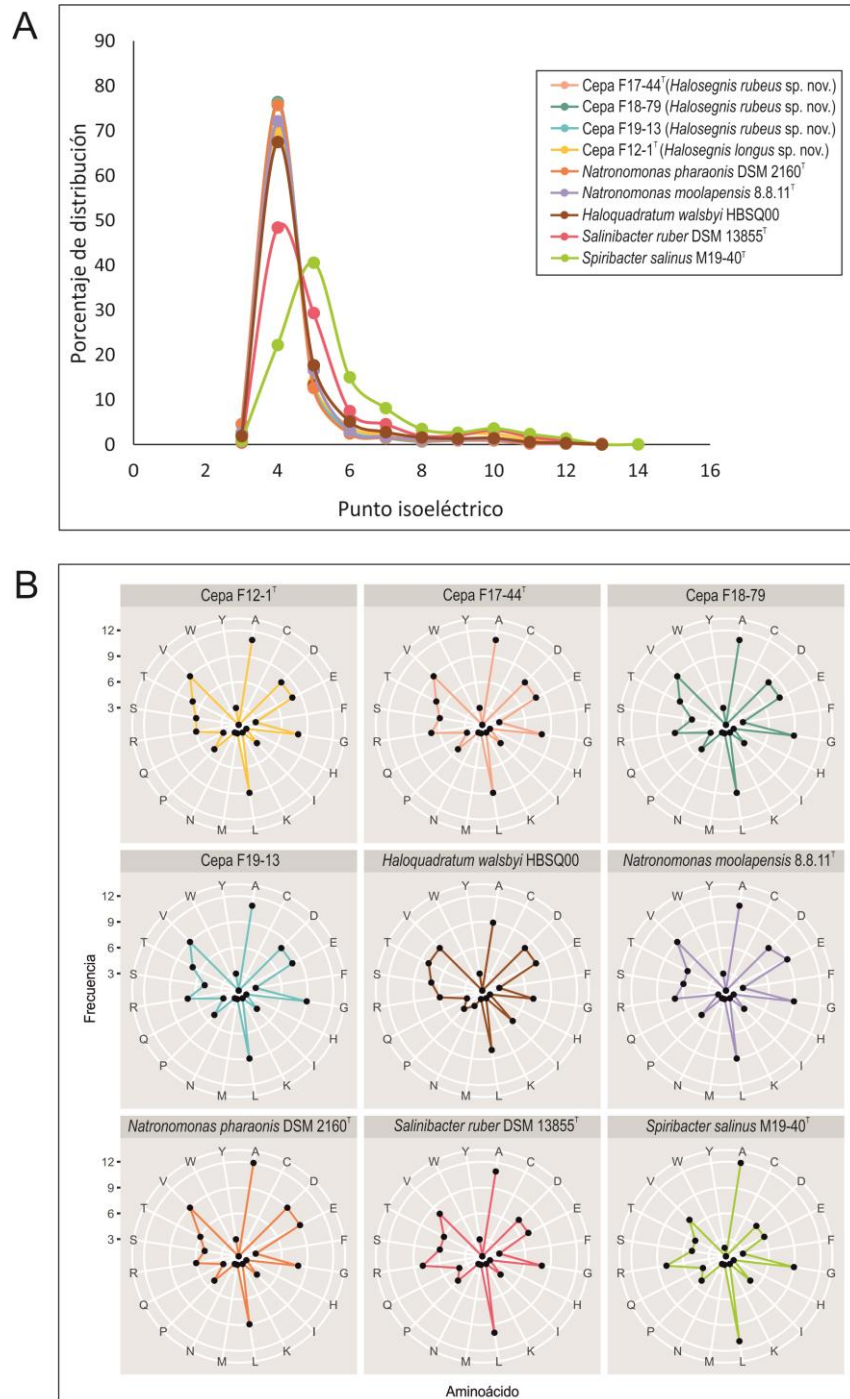


Figura 49. A) Comparación del perfil isoelectrico del proteoma de las especies de *Halosegnis* y el de otros procariotas, calculado para cada genoma traducido y mostrado como porcentaje de distribución. B) Comparación de la frecuencia de aminoácidos de las proteínas predichas para las especies del género *Halosegnis* y para otros procariotas, calculado para cada genoma traducido.

IV.2.IV.X. Rodopsinas

Como ya se ha descrito anteriormente, las rodopsinas son un grupo de proteínas foto-reactivas, las cuales generan un gradiente de protones mediado por la energía lumínica. Todas ellas se caracterizan por presentar una estructura común constituida por siete hélices transmembrana (Sharma *et al.*, 2007). Esta familia de proteínas se encuentra ampliamente distribuida en el mundo microbiano y fueron identificadas por primera vez en las haloarqueas a principios de los años 70 (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971; 1973), aunque años más tarde estudios genómicos y metagenómicos revelaron la existencia de homólogos en eucariotas y bacterias, y más tarde en el grupo II de *Euryarchaeotas* marinos (Frigaard *et al.*, 2006). Actualmente, podemos encontrar cuatro tipos de rodopsinas funcionales, bacteriorodopsinas de bombas de protones H^+ (BR) (Oesterhelt & Stoeckenius, 1973), halorodopsinas de bombas de cloruro Cl^- (HR) (Schobert & Lanyi, 1982) y dos tipos de rodopsinas sensoriales (Bogomolni & Spudich, 1982; Takahashi *et al.*, 1985).

Halobacterium salinarum y *Natronomonas pharaonis*, han sido extensamente utilizadas como modelos para el estudio de rodopsinas (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971; Matsuno-Yagi & Mukohata, 1977; Bivin & Stoeckenius, 1986; Duschl *et al.*, 1990; Verchère *et al.*, 2017; Engelhard *et al.*, 2018). Dada la proximidad filogenética de los nuevos aislados a especies del género *Natronomonas*, se decidió examinar la presencia de rodopsinas en estos genomas (Figuras 50A y 50B). Mientras que *Natronomonas pharaonis* posee halorodopsinas y rodopsinas de tipo sensorial (Kamekura, 1998; Falb *et al.*, 2005), las bombas de protones de haloarqueas han sido las únicas secuencias identificadas en los cuatro aislados, sugiriendo una síntesis de ATP mediada por la luz en estas cepas (Figura 50B). Por otro lado, *Natronomonas moolapensis* también se incluyó en este estudio, y al igual que los nuevos aislados, también muestra secuencias relacionadas con las bombas de protones de haloarqueas, aunque éstas se encuentran en una rama diferente a las de las especies del género *Halosegnis* (Figura 50B). La presencia de rodopsinas no es de extrañar, ya que estudios metagenómicos en diferentes ambientes hipersalinos (Fernández *et al.*, 2014a; Vera-Gargallo & Ventosa, 2018), sugieren que la luz es ampliamente utilizada en estos sistemas, dada la enorme cantidad de genes codificantes de los distintos tipos de rodopsinas en dichas bases de datos.

Al mismo tiempo, las rodopsinas pueden clasificarse en “absorbentes de luz verde” o de “luz azul” según la longitud de onda a la que absorban mayoritariamente, la cual viene dada a su vez por un único residuo aminoacídico (Man *et al.*, 2003). El alineamiento de las secuencias de rodopsinas identificadas en los genomas de las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, revela la presencia de un residuo de leucina (L) en esa posición, sugiriendo así una absorción preferente en el espectro del verde (Figura 50A).

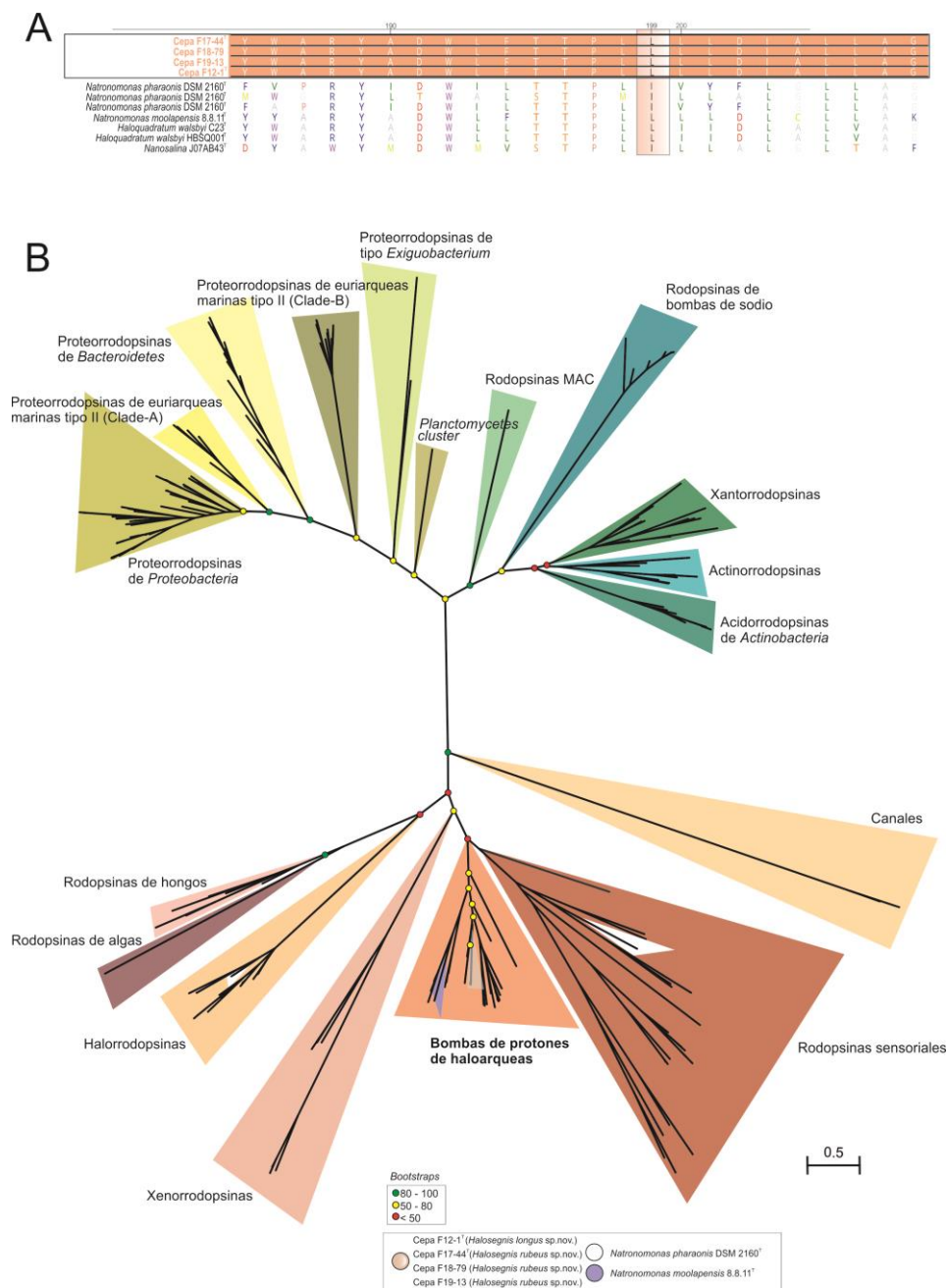


Figura 50. A) Comparación del alineamiento de las secuencias de rodopsinas de las especies del género *Halosegna* y otras haloarqueas estudiadas. Los números de acceso de los genomas utilizados se muestran entre paréntesis. En negrita aparecen las secuencias correspondientes a las cepas de *Halosegna*. La caja rosa muestra el aminoácido situado en la posición 199 del alineamiento. **B)** Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood* basado en la comparación de 220 secuencias de rodopsinas. Los triángulos con transparencia fueron utilizados para resaltar las secuencias de *Halosegna* y *Natronomonas* (ver leyenda en la parte inferior de la figura). En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

IV.3. Estudio de cepas pertenecientes al orden *Haloferacales*

IV.3.I. Aislamiento y caracterización de la cepa F13-13^T

De entre las más de 2000 colonias aisladas inicialmente, además de los grupos de cepas ya descritos relacionados con el orden *Halobacteriales*, identificamos otra cepa, denominada F13-13^T, aislada a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Cristina (27 % [p/v] NaCl y pH 7,5).

La cepa F13-13^T se encontraba filogenéticamente relacionada con la única especie descrita del género *Halonotius*, *Halonotius pteroides* 1.15.5^T, con un porcentaje de semejanza de 96,7 % en base a la comparación del gen ARNr 16S (1401 pb). Los porcentajes de semejanza con respecto a otros géneros relacionados, como *Halohasta* y *Halorubrum*, fueron inferiores a 93,9 %.

Con el fin de analizar con más detalle esta cepa y confirmar su posición filogenética exacta, se construyeron los árboles filogenéticos en base a este gen, utilizando los algoritmos *maximum-likelihood*, *neighbour-joining* y *maximum-parsimony*. En la Figura 51 se muestra el árbol filogenético obtenido en base al algoritmo *maximum-likelihood*. En este árbol se puede observar como la cepa F13-13^T se sitúa próxima a *Halonotius pteroides*, pero se localizan en ramas filogenéticas separadas con un valor de *bootstrap* de 100 %, sugiriendo así que pudiera tratarse de una nueva especie dentro de este género. Utilizando los otros dos algoritmos filogenéticos se obtuvieron resultados semejantes.

Continuando con la caracterización filogenética, también se llevó a cabo la secuenciación del gen *housekeeping rpoB'* y la construcción del árbol filogenético en base a este gen, representado en la Figura 52. De nuevo, la cepa F13-13^T se sitúa en una rama independiente a la de *Halonotius pteroides*, con un valor de *bootstrap* de 100 %, corroborando asimismo la posibilidad de que se trate de una nueva especie. Los porcentajes de semejanza obtenidos entre las secuencias del gen *rpoB'* de la cepa F13-13^T y de *Halonotius pteroides* 1.15.5^T es de 91,4 %.

Asimismo, tal y como requiere la taxonomía actual de procariotas, se secuenciaron los genomas de la cepa F13-13^T y de la especie *Halonotius pteroides* CECT 7525^T al no estar disponible en las bases de datos. Las características de estos genomas se recogen más adelante en la Tabla 31.

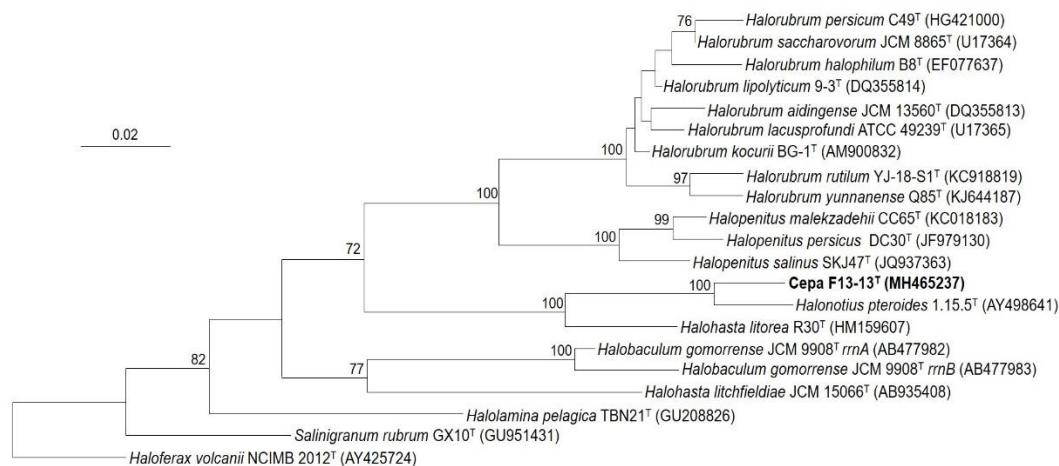


Figura 51. Árbol filogenético obtenido por el método *neighbour-joining*, basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-13^T, la especie *Halonotius pteroides* único representante del género *Halonotius* y especies de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. La especie *Haloferax volcanii* JCM 8879^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

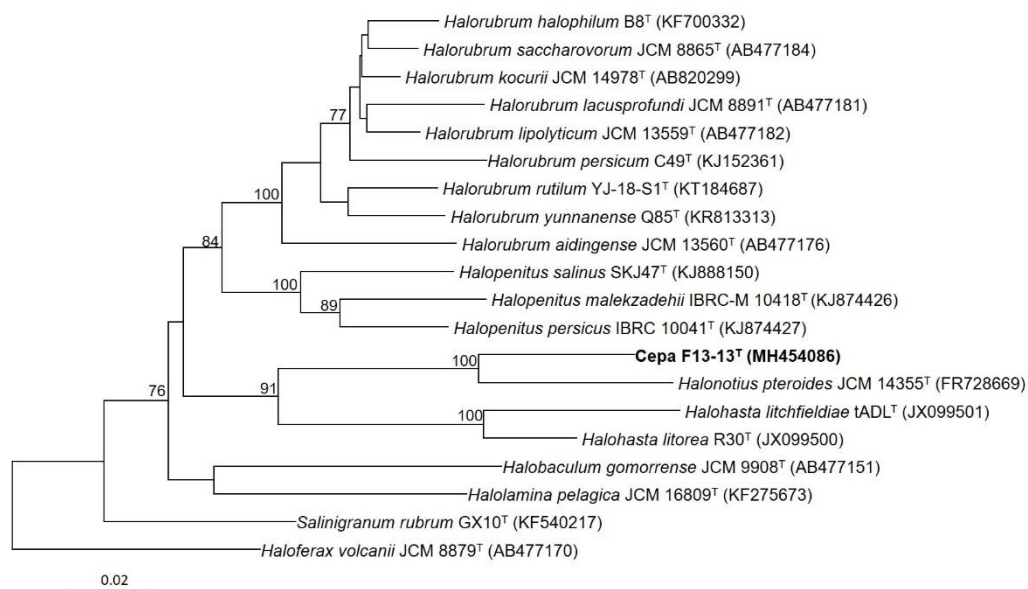


Figura 52. Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre la cepa F13-13^T, la especie *Halonotius pteroides* único representante del género *Halonotius* y especies de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o superiores al 70 %. La especie *Haloferax volcanii* NCIMB 2012^T se ha utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Con el objetivo de confirmar si efectivamente la cepa F13-13^T constituía una nueva especie dentro del género *Halonotius*, se calcularon los parámetros de identidad nucleotídica media (ANI) y de hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH) entre dichos genomas, siguiendo la metodología descrita en el apartado III.8.III.II. de Material y Métodos. El porcentaje de ANI entre la cepa F13-13^T y *Halonotius pteroides* CECT 7525^T fue de 88,7 %, y el de DDH fue de 35 %, valores muy por debajo de los límites establecidos en ambos casos para la delineación de especies procariotas (Goebel & Stackebrandt, 1994; Konstantinidis & Tiedje, 2004; Richter & Rosselló-Móra, 2009b; Auch *et al.*, 2010a), confirmando así que la cepa F13-13^T constituye una nueva especie dentro del género *Halonotius*, para la cual proponemos el nombre de *Halonotius aquaticus* sp. nov.

Con respecto a la caracterización fenotípica, la cepa F13-13^T crece en medio R2A al 25 % de NaCl, produce colonias circulares, con borde entero, de pigmentación roja y de 0,3-0,4 mm de diámetro. Sus células presentan morfología bacilar, son móviles, se tiñen como Gram-negativas y de un tamaño entre 0,5 x 1,1-4,4 µm (Figura 53). Otros resultados de la caracterización fenotípica se detallan en la descripción de la especie y en la Tabla 28, en la cual se incluyen las características que diferencian esta nueva especie de *Halonotius pteroides* CECT 7525^T.



Figura 53. Microfotografía en contraste de fases de las células de la cepa F13-13^T. Escala, 10 µm.

Tabla 28. Características que diferencian a la cepa F13-13^T de la especie *Halonotius pteroides*. Cepas: 1, F13-13^T; 2, *Halonotius pteroides* CECT 7525^T. Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con *, datos tomados de Burns *et al.*, (2010b). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.

Características	1	2
Morfología	Bacilos largos y curvados, a veces en parejas	Bacilos planos*
Tamaño celular (µm)	0,5 x 1,1-4,4	0,7-1,5 x 2-6*
Tamaño de la colonia (mm)	0,3-0,4	0,5-1,0*
Rango NaCl (% p/v)	15-30	16-36*
NaCl óptimo (% p/v)	25	18*
Rango temperatura (°C)	28-50	25-45*
Temperatura óptima (°C)	37	45

Características	1	2
Rango pH	6,0-8,5	5,0-8,5*
pH óptimo	7,5	7,5*
Crecimiento en anaerobiosis:		
L-Arginina	+	-
Dimetilsulfóxido	+	w
Producción de ácidos:		
D-Amigdalina	+	-
D,L-Arabinosa	+	w
Arbutina	-	w
D-Fructosa	+	-
D-Glucosa	w	-
Glicerol	-	+
Sorbitol	-	w
Utilización de ^a :		
Butanol	-	+
Citrato	+	-
Fructosa	-	+
Isoleucina	-	+
D-Melobiosa	+	-
Metanol	-	+
Piruvato	-	+
L-Rafinosa	+	-
D-Sorbitol	-	+
Contenido en G+C del ADN (moles%, genoma)	61,2	59,7

^aComo única fuente de carbono y energía

Esta caracterización ha sido llevada a cabo siguiendo las recomendaciones para la descripción de nuevos taxones del orden *Halobacteriales* (Oren et al., 1997).

Por otro lado se realizó la caracterización quimiotaxonómica de la cepa F13-13^T, siguiendo la metodología descrita en el apartado III.6. de Material y Métodos. Las especies *Halobacterium salinarum* DSM3754^T, *Halohasta litorea* JCM 17270^T, *Halohasta litchfieldiae* JCM 15066^T, *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137^T y *Halonotius pteroides* CECT 7525^T, se utilizaron como cepas de referencia para este estudio.

Con respecto a la caracterización quimiotaxonómica, los resultados del perfil lipídico (mostrados en la Figura 54), indican que la cepa F13-13^T presenta como lípidos mayoritarios fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1). El perfil lipídico de la cepa F13-13^T es muy similar al descrito para *Halonotius pteroides* 1.15.5^T, pero la presencia adicional de dos lípidos minoritarios, bifosfatidilglicerol (BPG) y ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico (S-TGD-1-PA), no descritos para *Halonotius pteroides* 1.15.5^T, aportan una evidencia más de su estatus como nueva especie.

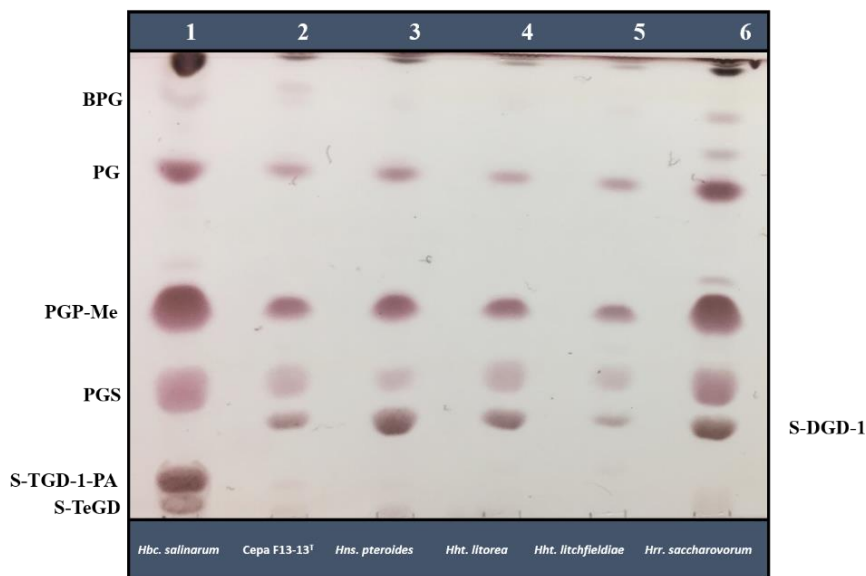


Figura 54. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos polares de la cepa F13-13^T y otras especies de haloarqueas. La placa se reveló con ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C. Carriles: 1, *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T; 2, Cepa F13-13^T; 3, *Halonotius pteroides* CECT 7525^T; 4, *Halohasta litorea* JCM 17270^T; 5, *Halohasta litchfieldiae* JCM 15066^T; 6, *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137^T.

Abreviaciones: BPG, bifosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PGP-Me, fosfatidilglicerol fosfato metil éster; PGS, fosfatidilglicerol sulfato; S-DGD-1, sulfato diglicosil diéter; S-TGD-1-PA, ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico; S-TeGD, sulfato tetraglicosil diéter.

Los resultados obtenidos en este estudio referentes a la caracterización polifásica y genómica de la cepa F13-13^T, aislada a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Cristina, confirman que se trata de una nueva especie dentro del género *Halonotius*, para la cual se propone el nombre de *Halonotius aquaticus* sp. nov. La descripción de esta nueva especie ha sido publicada en 2019 en el *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Durán-Viseras et al., 2019c).

IV.3.1.1. Descripción de *Halonotius aquaticus* sp. nov.

Halonotius aquaticus (a.qua'ti.cus. L. masc. adj. *aquaticus*, acuático, que vive o se encuentra en el agua).

En cultivo joven en su medio óptimo las células presentan morfología de bacilo largo y curvado, a veces asociadas por parejas, de 0,5 x 1,1-4,4 µm de tamaño. Móviles. Se tiñen como Gram-negativas. Las colonias son circulares, de borde entero, de color rojo y con 0,3-0,4 mm de diámetro en medio R2A 25 % después de 10 días de incubación a 37 °C. Halófila extrema, crece en presencia de 15-30 % (p/v) de NaCl, con un crecimiento óptimo al 25 % (p/v) de NaCl. No crece en ausencia de NaCl. Crece a 28-50 °C, con un crecimiento óptimo a 37 °C, y a valores de pH que oscilan entre 6,0-8,5, con un óptimo de crecimiento a pH 7,5. Capaz de crecer en anaerobiosis en presencia de L-arginina y dimetilsulfóxido, pero no en presencia de nitrato potásico. Catalasa y oxidasa negativas. No hidroliza la gelatina, la esculina, el almidón ni el Tween 80. Reduce los nitratos, pero no los nitritos. No produce H₂S. Las pruebas de citrato de Simmons, Voges-Proskauer y ureasa son negativas. La prueba de rojo de metilo es débilmente positiva. No produce indol. Lisina, arginina y ornitina descarboxilasas negativas. Produce ácidos a partir de D-amigdalina, D,L- arabinosa, D-fructosa, D-glucosa y D-xilosa, pero no a partir de arbutina, L-citrulina, dulcitol, D,L-etionina, D-galactosa, glicerol, inulina, lactosa, maltosa, D-manitol, melecitosa, rafinosa, sacarosa, sorbitol y L-xilitol. Utiliza glucosa, melobiosa, rafinosa, glicerol y citrato son utilizados como única fuente de carbono y energía, pero no D-arabinosa, benzoato, celobiosa, dulcitol, D-etanol, formiato, fructosa, fumarato, galactosa, lactosa, malato, maltosa, D-manitol, D-manosa, melecitosa, propionato, D-ribosa, salicina, sacarosa, tartrato, trealosa, xilitol, D-xilosa y valerato. No es capaz de utilizar ningún aminoácido como fuente de nitrógeno, carbono y energía.

Los lípidos mayoritarios son fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1). El contenido en G+C del ADN es de 61,2 moles% (genoma).

La cepa tipo es F13-13^T (= CECT 9386^T = IBRC-M 11204^T), aislada a partir de un estanque de las salinas de Isla Cristina, Huelva.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S y al gen *rpoB*' de la especie *Halonotius aquaticus* F13-13^T, han sido depositadas en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ, bajo los números de acceso MH465237 y MH454086, respectivamente. El genoma de la misma también se ha depositado allí con el número de acceso QKNY000000000.

IV.3.II. Aislamiento y caracterización de las cepas F15B^T y F9-27^T

En un esfuerzo por continuar aislando nuevos grupos, conseguimos aislar dos cepas más, designadas como F15B^T y F9-27^T, a partir de una muestra de suelo salino de las Marismas del Odiel y a partir de una muestra de agua de las salinas de Isla Cristina, respectivamente. Estas cepas también se encontraban estrechamente relacionadas con el género *Halonotius*, el cual ya había sido estudiado con anterioridad durante el transcurso de esta Tesis Doctoral. Con el fin de confirmar si estas nuevas cepas podrían constituir nuevos grupos dentro de este género, se procedió a realizar un estudio más detallado de las mismas.

En base a la secuencia casi completa del gen ARNr 16S, las cepas F15B^T (1400 pb) y F9-27^T (1394 pb) presentaban porcentajes de semejanza con *Halonotius aquaticus* F13-13^T y *Halonotius pteroides* 1.15.5^T de 96,4 y 96,9 %, respectivamente. El porcentaje de semejanza entre ambas secuencias era a su vez de 95,8 %. La semejanza con respecto a las especies de otros géneros relacionados, como *Halohasta* o *Halorubrum*, fue en todos los casos inferiores al 94 y 87 %, respectivamente.

La construcción del árbol filogenético en base al gen ARNr 16S (Figura 55A) mostró que las cepas F15B^T y F9-27^T se agrupaban con las especies ya descritas del género *Halonotius*, pero se situaban en ramas independientes entre ellas, y a su vez, alejadas de *Halonotius pteroides* CECT 7525^T y *Halonotius aquaticus* F13-13^T. La topología del árbol filogenético, así como los valores de semejanza obtenidos (inferiores al 97 % con respecto a las secuencias de las especies descritas y entre ellas mismas), sugirió la posibilidad de que pudiera tratarse de dos nuevas especies dentro de este género.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el gen ARNr 16S no resulta un marcador útil en el estudio de las relaciones filogenéticas entre haloarqueas, y por lo tanto, también se secuenció el gen *housekeeping rpoB* y se construyó el árbol filogenético en base a dicho gen (Figura 55B). En concordancia con el árbol obtenido para el gen ARNr 16S, ambas cepas se localizan en la rama correspondiente al género *Halonotius*, pero separadas en ramas filogenéticamente distantes. En este caso, la secuencia de la cepa F15B^T (1827 pb) mostró un 89,1 % de semejanza nucleotídica con *Halonotius aquaticus* F13-13^T, mientras que la cepa F9-27^T, 91,8 % con *Halonotius aquaticus* F13-13^T, respectivamente. A su vez, el porcentaje de semejanza entre las secuencias de ambas cepas fue de 89,3 %.

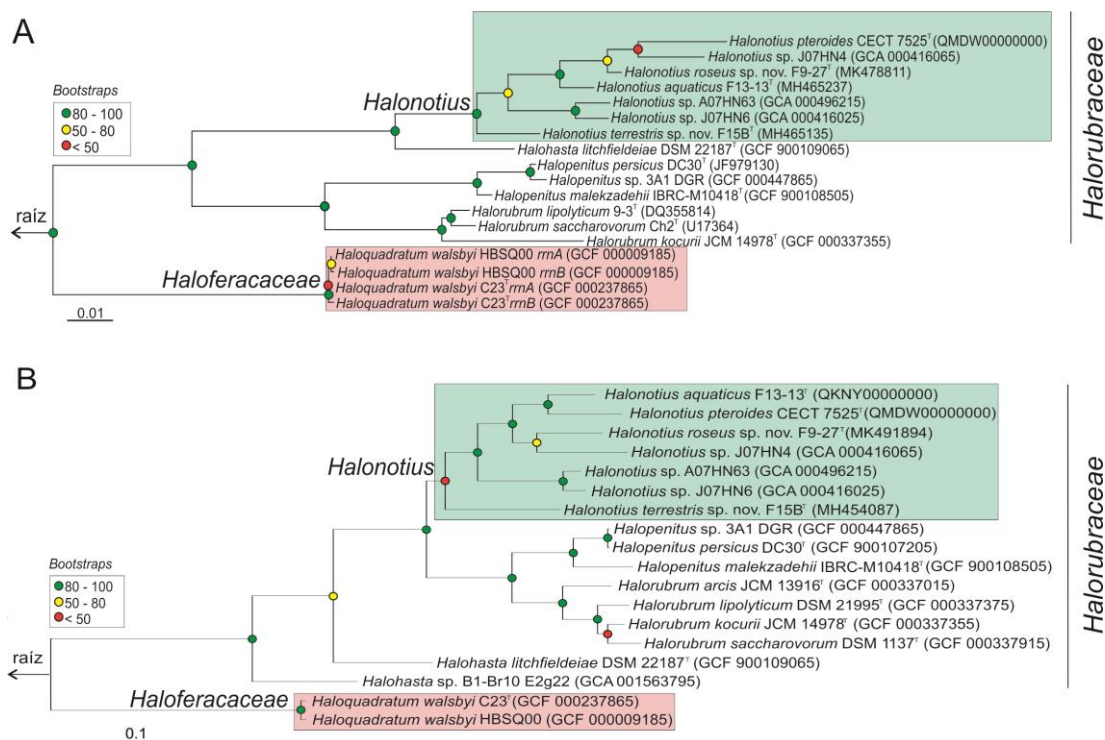


Figura 55. A) Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen ARNr 16S, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F15B^T y F9-27^T y las especies del género *Halonotius* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. **B)** Árbol filogenético obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de secuencias del gen *rpoB*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F15B^T y F9-27^T y las especies del género *Halonotius* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. *Candidatus Nanosalinarum* J07AB56 y *Candidatus Nanosalina* J07AB43 se han utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Por otro lado, se secuenció el genoma de las cepas F15B^T y F9-27^T cuyas características, así como las de las otras dos especies descritas del género se detallan más adelante.

Para confirmar las relaciones filogenéticas previamente obtenidas tras la comparación de las secuencias de los genes ARNr 16S y *rpoB*, se construyó un árbol filogenómico en base al total de genes ortólogos comunes (*core-orthologous genes*) entre las cepas de *Halonotius*, varios genomas ambientales de *Halonotius* (MAGs) y otras especies de haloarqueas relacionadas. En total estas cepas compartieron 257 genes, entre todos los genomas analizados. Los resultados de este árbol se muestran en la Figura 56, en el cual,

todos los genomas de *Halonotius* se agrupan juntos formando una única rama, filogenómicamente distante al resto de grupos de haloarqueas y reforzada con valores elevados de *bootstrap*. Por otra parte, dentro de esta rama y con valores de *bootstrap* también elevados, todas las cepas de *Halonotius* se sitúan monofiléticamente separadas, apoyando así la hipótesis de que se trate de dos nuevas especies dentro de este género. Esta topología está en concordancia con la filogenia inicial descrita para los genes ARNr 16S y *rpoB*, indicando así, que ambos genes constituyen marcadores filogenéticos fiables en el caso del género *Halonotius*.

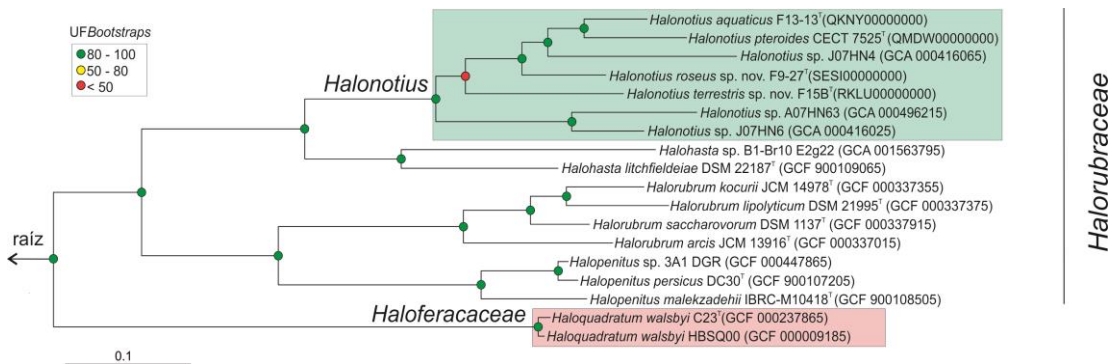


Figura 56. Árbol filogenómico obtenido por el método *maximum-likelihood*, basado en la comparación de 257 genes *core-orthologous*, en el que se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas F15B^T y F9-27^T y las especies del género *Halonotius* y de otros géneros filogenéticamente cercanos. Los números de acceso de las secuencias utilizadas se indican entre paréntesis. En los nodos, los círculos rojos indican los valores de *bootstrap* inferiores al 50 %, los amarillos los valores comprendidos entre 50 y 80 % y los verdes, los valores de *bootstrap* superiores al 80 %. *Candidatus Nanosalinarum* J07AB56 y *Candidatus Nanosalina* J07AB43 se han utilizado como *outgroup*. La escala representa el número de sustituciones por nucleótido.

Con la finalidad de confirmar la condición de nuevos taxa de las cepas F15B^T y F9-27^T dentro del género *Halonotius*, se calcularon los parámetros de identidad aminoacídica media (AAI), identidad nucleotídica media (ANI) e hibridación ADN-ADN *in silico* (DDH), entre los genomas de las nuevas cepas aisladas, los de las especies ya descritas del género, *Halonotius pteroides* CECT 7525^T y *Halonotius aquaticus* F13-13^T y otros genomas ambientales (MAGs) del género *Halonotius*, siguiendo la metodología descrita en el apartado III.8.III.II. de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se representaron mediante mapas de calor en la Figura 57 y en la Tabla 29. Los valores de AAI entre todos los genomas de *Halonotius* analizados fueron superiores en todos los casos al 65 % (Klappenbach *et al.*, 2007; Konstantinidis *et al.*, 2017), corroborando así que todos ellos pertenecen al mismo género. Por otra parte, los valores de ANI y de DDH son inferiores en todos los casos al 95-96 % y al 70 % (Stackebrandt & Goebel, 1994; Konstantinidis & Tiedje, 2004; Richter & Rosselló-Móra, 2009; Auch *et al.*, 2010a), respectivamente, y confirman que se trata de dos nuevas especies dentro del género *Halonotius*.

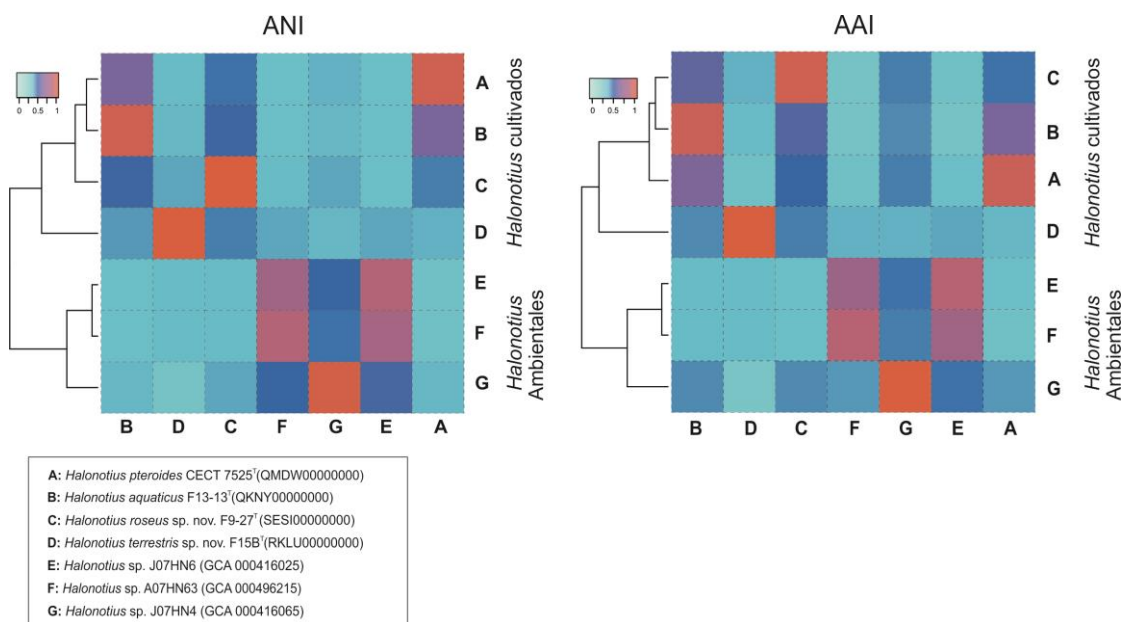


Figura 57. Agrupamientos jerárquicos entre los genomas de *Halonotius* cultivados y los genomas ambientales de *Halonotius*. Los valores de ANI y AAI se representan mediante mapas de calor, cuyos valores de semejanza vienen determinados por la escala de color situada en la parte superior de cada imagen. La designación de las cepas y sus números de acceso se encuentran detallados en el panel inferior.

Tabla 29. Matriz con los porcentajes de ANI y DDH obtenidos entre los genomas de las cepas pertenecientes al género *Halonotius*.

<i>In silico</i> DDH \ ANI	1	2	3	4	5	6	7
1. Cepa F15B ^T	-	81,8	81,0	79,7	78,9	80,3	80,3
2. Cepa F9-27 ^T	33,3	-	85,2	83,8	82,2	80,0	80,0
3. <i>Halonotius aquaticus</i> F13-13 ^T	24,7	29,6	-	88,2	81,0	79,4	79,3
4. <i>Halonotius pteroides</i> CECT 7525 ^T	23,4	27,8	35,7	-	80,9	79,1	79,1
5. <i>Halonotius</i> sp. J07HN4	22,7	25,6	24,4	24,7	-	86,1	84,9
6. <i>Halonotius</i> sp. J07HN6	23,9	24,6	24,0	23,9	39,2	-	96,6
7. <i>Halonotius</i> sp. A07HN63	24,0	24,6	23,8	23,9	36,5	71,1	-

Para poder describir estos aislados como nuevos taxones, se llevó a cabo una completa caracterización fenotípica, de acuerdo a las recomendaciones para la descripción de nuevos taxones del orden *Halobacteriales* (Oren et al., 1997), así como una exhaustiva caracterización quimiotaxonómica de los mismos. Para estas caracterizaciones, se ha seguido la metodología descrita en los apartados III.7 y III.6, respectivamente, de Material y Métodos.

Para la caracterización fenotípica de las cepas F15B^T y F9-27^T, se utilizaron como referencia las cepas tipo de las especies *Halonotius pteroides* CECT 7525^T y *Halonotius aquaticus* F13-13^T. Los resultados correspondientes a las características diferenciales entre todas ellas se muestran en la Tabla 30. El resto de resultados, se detallan en la descripción taxonómica de cada nueva especie.

Para el estudio quimiotaxonómico, se realizó la determinación del perfil de lípidos polares, fosfolípidos y lípidos totales presentes en las cepas F15B^T y F9-27^T, así como en el resto de especies descritas del género *Halonotius*. En este estudio también se utilizaron *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137^T y *Halobacterium salinarum* DSM 3754^T como cepas de referencia. Los resultados (Figura 58), indican que todas las cepas del género *Halonotius* presentan fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1) como lípidos mayoritarios. Debido a que la presencia de fosfatidilglicerol (PG) no había sido incluida previamente en la descripción del género *Halonotius*, ni en *Halonotius pteroides* (Burns et al., 2010b), en esta Tesis Doctoral se propone hacer una descripción corregida de este género.

En base a los estudios filogenéticos basados en la comparación de las secuencias de los genes ARNr 16S, *rpoB*, y otros genes comunes, así como los valores obtenidos del porcentaje de identidad nucleotídica media e hibridación ADN-ADN *in silico*, junto a los resultados obtenidos en la completa caracterización fenotípica y quimiotaxonómica, demuestran claramente que las cepas F15B^T y F9-27^T constituyen dos nuevas especies dentro del género *Halonotius*, para las cuales proponemos los nombres de *Halonotius terrestris* sp. nov. y *Halonotius roseus* sp. nov., respectivamente. Esta propuesta ha sido recientemente publicada (Durán-Viseras et al., 2019b) en la revista *Frontiers in Microbiology*, aunque sus nombres están pendientes de que se validen tras su publicación en la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Tabla 30. Características que diferencian a las cepas F15B^T y F9-27^T de las especies descritas del género *Halonotius*.
Cepas: 1, F15B^T; 2, F9-27^T; 3, *Halonotius aquaticus* F13-13^T; 4, *Halonotius pteroides* CECT 7525^T. Todos los datos son de este estudio excepto los indicados con *, datos tomados de Burns *et al.*, (2010b). +, Reacción positiva; -, reacción negativa; w, débilmente positivo.

Características	1	2	3	4
Morfología	Bacilos cortos y a veces pleomórficos	Pleomórficos	Bacilos largos y curvados, a veces en parejas	Bacilos planos*
Tamaño celular (µm)	1,1 x 1,7	2,8 x 1,1	1,1-4,4 x 0,5	0,7-1,5 x 2-6*
Tamaño de la colonia (mm)	0,2	0,1	0,3-0,4	0,5-1,0*
Rango NaCl (% p/v)	15-30	15-30	15-30	16-36*
NaCl óptimo (% p/v)	25	25	25	18*
Rango temperatura (°C)	25-50	25-50	28-50	25-45*
Temperatura óptima (°C)	37	37	37	45*
Rango pH	7,0-7,5	7,0-9,0	6,0-8,5	5,0-8,5*
pH óptimo	7,0	7,5	7,5	7,5*
Crecimiento en anaerobiosis:				
L-Arginina	-	-	+	-
Nitrato potásico	-	-	-	w
Dimetilsulfóxido	-	-	+	w
Reducción de nitratos	+	+	-	-
Prueba rojo de metilo	+	-	w	w
Producción H ₂ S	-	+	-	-
Producción de ácidos:				
D-Amigdalina	-	-	+	-
D,L-Arabinosa	w	-	+	w
Arbutina	-	-	-	w
D-Fructosa	w	-	+	-
D-Glucosa	-	-	w	-
Glicerol	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	w
D-Xilosa	+	-	+	+
Utilización de ^a :				
L-Alanina	+	-	-	-
L-Arginina	+	-	-	-
Butanol	-	w	-	+
Citrato	-	-	+	-
D-Galactosa	+	-	-	-
D-Glucosa	+	-	+	+
Glicerol	+	-	+	+
Isoleucina	-	-	-	+
D-Manitol	+	-	-	-
Maltosa	+	-	-	-
Metanol	-	-	-	+
Piruvato	-	-	-	+
L-Rafinosa	+	-	+	-
D-Sorbitol	-	-	-	+
Sacarosa	-	+	-	-
D-Xilosa	-	w	-	-
Contenido en G+C del ADN (moles%, genoma)	61.5	62.7	61.2	59.7

^aComo fuente de carbono y energía

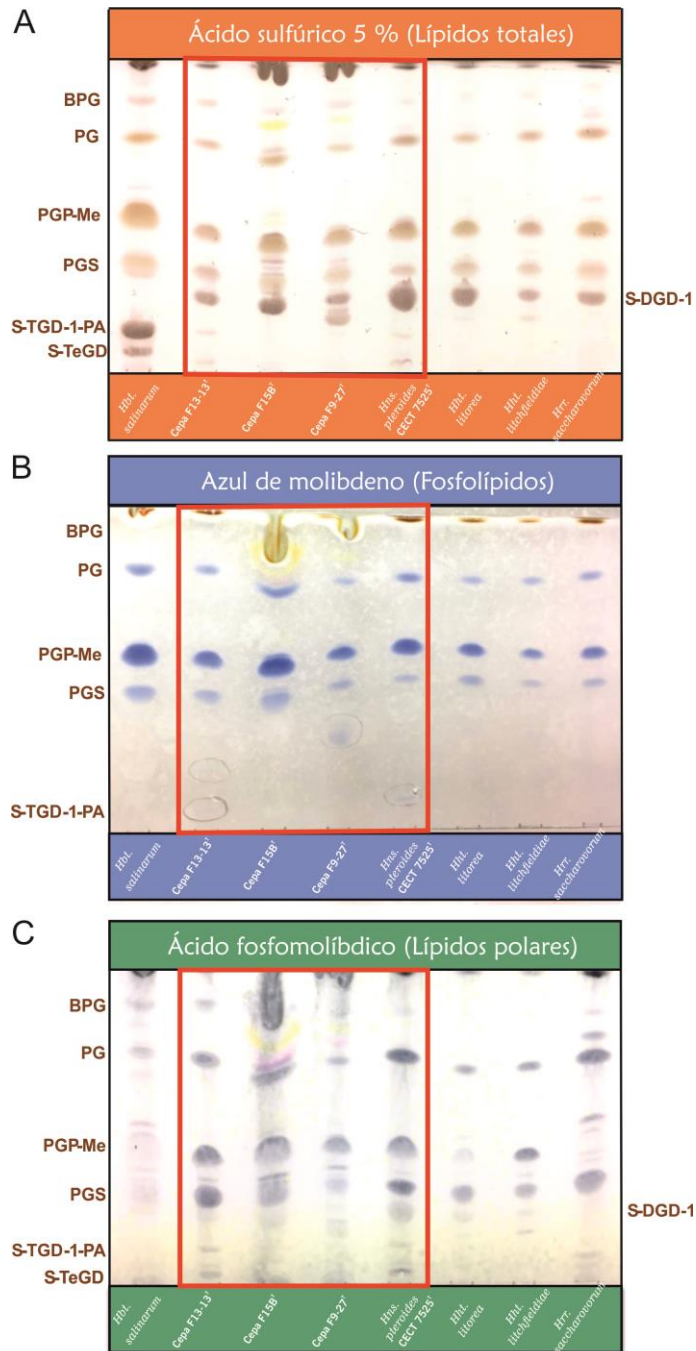


Figura 58. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) del perfil de lípidos de las cepas F15B^T y F9-27^T y otras especies de haloarqueas. Las placas se revelaron con **A)** ácido sulfúrico al 5 % en agua, seguido de calentamiento de la placa a 160 °C, **B)** azul de molibdeno, **C)** ácido fosfomolibdico.

Abreviaciones: BPG, bifosfatidilglicerol; PG, fosfatidilglicerol; PGP-Me, fosfatidilglicerol fosfato metil éster; PGS, fosfatidilglicerol sulfato; S-DGD-1, sulfato diglicosil diéter; S-TGD-1-PA, ácido sulfato galactosil manosil glucosil diéter fosfatídico; S-TeGD, sulfato tetraglicosil diéter.

IV.3.II.I. Descripción de *Halonotius terrestris* sp. nov.

Halonotius terrestris (ter.res'tris. L. fem. adj. *terrestris*, terrestre, que vive o se encuentra en la tierra).

Las células son móviles, se tiñen como Gram-negativas, y poseen morfología bacilar o a veces pleomórficas. El tamaño de las células es de 1,1 x 1,7 µm. Las colonias en medio R2A 25 % después de 10 días de incubación a 37 °C son circulares, de borde entero y de pigmentación roja, con un diámetro de 0,2 mm. Halófilo extremo. No crece en ausencia de NaCl. Crece a concentraciones de 15-30 % (p/v) de NaCl (óptimo a 25 % [p/v] NaCl), a pH entre 7-7,5 (óptimo a pH 7,5) y entre 25-50 °C (óptimo a 37 °C). Catalasa y oxidasa positivas. No hidroliza el almidón, el Tween 80, la gelatina o la esculina. Reduce los nitratos y los nitritos sin producción de gas. No produce H₂S. Las pruebas de Voges-Proskauer y citrato de Simmons son negativas. No produce indol. La prueba de rojo de metilo es positiva. Lisina, arginina y ornitina descarboxilasas negativas. Produce ácidos a partir de diversos carbohidratos: D,L-arabinosa, D-fructosa, D-ribosa y D-xilosa, pero no a partir de D-amigdalina, arbutina, D-celobiosa, L-citrulina, dulcitol, D,L-etionina, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, inulina, lactosa, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melecitosa, D-melobiosa, D-rafinosa, sorbitol, D-sacarosa, D-trealosa y L-xilitol. Utiliza la D-galactosa, D-glucosa, glicerol, maltosa, D-manitol, L-rafinosa y tartrato como única fuente de carbono y energía; sin embargo, no utiliza los siguientes compuestos: D-arabinosa, butanol, D-celobiosa, D-dulcitol, D-etanol, fructosa, lactosa, D-manosa, D-melobiosa, metanol, D-melecitosa, D-ribosa, salicina, sorbitol, sacarosa, D-trealosa, xilitol y D-xilosa. Es capaz de utilizar L-arginina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, pero no L-alanina, L-cisteína, glutamina, L-metionina, L-glicina, L-lisina, isoleucina y valina.

Los lípidos mayoritarios son fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1). El contenido en G+C del ADN es de 61,9 moles% (genoma).

La cepa tipo es F15B^T (= CECT 9688^T = CCM 8954^T), aislada a partir de un suelo hipersalino situado en las Marismas del Odiel, Huelva.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S y al gen *rpoB*' de la especie *Halonotius terrestris* F15B^T, han sido depositadas en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ, bajo los números de acceso MH465135 y MH454087, respectivamente. El genoma de la misma también ha sido depositado allí con el número de acceso RKL000000000.

IV.3.II.II. Descripción de *Halonotius roseus* sp. nov.

Halonotius roseus (ro'se.us. L. masc. adj. roseus, de color rosado o rosa).

Son células pleomórficas, móviles y de un tamaño de 1,1 x 2,8 µm. Se tiñen como Gram-negativas. Las colonias son de pigmentación rosa, circulares y con borde entero, con un tamaño de 0,1 mm de diámetro en medio R2A 25 % después de 10 días de incubación a 37 °C. Capaz de crecer en un rango de temperatura entre 25-50 °C (óptimamente a 37 °C) y en un intervalo de pH de 7,0 a 9,0 (óptimamente a pH 7,5). Halófilo extremo. No se observa crecimiento en ausencia de NaCl. Crece entre el 15-30 % (p/v) de NaCl y de forma óptima en medios que contienen 25 % (p/v) de NaCl. Catalasa y oxidasa positivas. Reduce los nitratos pero no los nitritos. No es capaz de hidrolizar la gelatina, el almidón, la esculina o el Tween 80. Produce H₂S. Las pruebas de rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato de Simmons son negativas. No produce indol. Lisina, arginina y ornitina descarboxilasas negativas. Produce ácidos a partir de D-ribosa pero no a partir de D-amigdalina, D,L-arabinosa, arbutina, D-celobiosa, L-citrulina, dulcitol, D, L-etionina, D-fructosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, inulina, lactosa, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melecitosa, D-melobiosa, D-rafinosa, sorbitol, D-sacarosa, D-trealosa, L-xilitol y D-xilosa. Utiliza los siguientes compuestos como única fuente de carbono y energía: sacarosa, butanol, tartrato y D-xilosa; sin embargo, no utiliza: D-arabinosa, D-celobiosa, D-dulcitol, D-etanol, fructosa, galactosa, D-glucosa, glicerol, lactosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melecitosa, D-melobiosa, metanol, L-rafinosa, D-ribosa, salicina, sorbitol, D-trealosa y xilitol. Utiliza L-alanina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, pero no es capaz de utilizar L-arginina, L-cisteína, glutamina, L-metionina, L-glicina, L-lisina, isoleucina o valina.

Al igual que *H. aquaticus* y *H. terrestris*, muestra el patrón lipídico característico de las especies del género *Halonotius*. Los lípidos polares incluyen fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1). El contenido en G+C del ADN es de 62,7 moles% (genoma).

La cepa tipo es F9-27^T (= CECT 9745^T = CCM 8956^T), aislada a partir de un estanque de las salinas de Isla Cristina, Huelva.

Las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S y al gen *rpoB*⁷ de la especie *Halonotius roseus* F9-27^T, han sido depositadas en la base de datos GenBank/EMBL/DBJ, bajo los

números de acceso MH478811 y MK491894, respectivamente. El genoma de la misma también ha sido depositado allí con el número de acceso SES100000000.

IV.3.II.III. Descripción corregida del género *Halonotius* (Burns et al., 2010b)

Las características del género *Halonotius* son las mismas que las descritas por Burns et al., (2010b), con las siguientes modificaciones.

El género se encuentra en de la familia *Halorubraceae*, dentro del orden *Haloferacales* y la clase *Halobacteria*. El perfil lipídico se caracteriza por la presencia de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerol fosfato metil éster (PGP-Me), fosfatidilglicerol sulfato (PGS) y un glicolípido cromatográficamente idéntico a sulfato manosil glucosil diéter (S-DGD-1). El contenido en G+C del ADN oscila entre 59,5 y 62,7 moles% (genoma).

IV.3.III. Análisis genómico comparativo del género *Halonotius*

A pesar de que numerosos estudios han puesto de manifiesto la presencia de representantes del género *Halonotius* en diversos ambientes hipersalinos (Makhdoumi-Kakhki et al., 2012; Podell et al., 2013; Çınar & Mutlu, 2016; Haferburg et al., 2017; Han et al., 2017; Vera-Gargallo & Ventosa, 2018), a partir de los cuales incluso se han conseguido obtener varios genomas ambientales a partir de metagenomas, este género, sin embargo, puede ser considerado como uno de los grandes desconocidos dentro de los ambientes hipersalinos. El género *Halonotius* fue inicialmente descrito en el año 2010 (Burns et al., 2010b) con una única especie, a partir de un grupo de cepas filogenéticamente relacionadas con una serie de secuencias identificadas como abundantes en el Lago Deep (Antártida). No ha sido hasta nueve años más tarde, durante esta Tesis Doctoral, cuando se ha conseguido aislar nuevas especies pertenecientes a este género, concretamente tres nuevas especies.

Con el fin de profundizar en este gran desconocido y explorar su posible potencial, se decidió realizar un estudio más detallado a nivel genómico, que incluyera las cuatro especies del género *Halonotius*, así como los tres genomas ambientales previamente descritos. Este trabajo de investigación, ha sido llevado a cabo durante una estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Rohit Ghai, en el Instituto de Hidrobiología de la Academia Checa de Ciencias, en České Budějovice (República Checa) y sus resultados han sido recientemente publicados (Durán-Viseras et al., 2019b) en la revista *Frontiers in Microbiology*.

Todos los genomas de *Halonotius* han sido secuenciados en esta Tesis Doctoral, y sus principales características se detallan en la Tabla 31. Como la mayoría de miembros pertenecientes a la clase *Halobacteria* (filo *Euryarchaeota*), todos los genomas de *Halonotius* muestran valores altos de contenido en G+C, en concreto dichos valores oscilan entre 59,5 y 62,7 moles%, siendo *Halonotius roseus* F9-27^T el que presenta porcentajes más altos. Por otra parte, los cuatro genomas de *Halonotius* poseen un tamaño similar, comprendido entre 2,5 y 3,0 Mb, siendo así los más pequeños descritos hasta la fecha para la familia *Halorubraceae*.

Tabla 31. Características generales de los genomas de las cepas tipo de las especies del género *Halonotius* secuenciados en este estudio.

Característica	<i>Halonotius terrestris</i> F15B ^T	<i>Halonotius roseus</i> F9-27 ^T	<i>Halonotius aquaticus</i> F13-13 ^T	<i>Halonotius pteroides</i> CECT 7525 ^T
Tamaño (Mb)	2,9	2,6	2,5	3,0
N° de contigs	26	4	10	41
Compleitud (%)	98,4	99,4	99,2	99,6
G+C (moles%)	61,5	62,7	61,2	59,5
N° de CDS	3067	2686	2568	3092
N° de ARNr	5	2	3	4
N° de ARNt	47	44	45	45
Números de acceso	RKLU000000000	SESI000000000	QKNY000000000	QMDW000000000

Otras características adicionales de los genomas estudiados se muestran en la Figura S4 del Anexo.

IV.3.III.I. Ecología, distribución y abundancia del género *Halonotius*

Como ya se ha comentado, estudios metagenómicos previos en ambientes hipersalinos han puesto de manifiesto que una gran proporción de los de los microorganismos, abundantes en este tipo de ambientes, aún no han sido aislados en cultivo puro (Ventosa *et al.*, 2015), siendo éste uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral. Con la idea de identificar si, tal y como nos habíamos propuesto, el género *Halonotius* era uno de estos grupos, calculamos el porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas con *Euryarchaeota* y las relacionadas con *Halonotius* en diferentes bases de datos metagenómicas de distintas salinidades (ver Tabla 9 de Material y Métodos), tanto de muestras de agua salina (Figura 59A) como de muestras de suelos hipersalinos (Figura 59B).

Los resultados indican que los miembros del género *Halonotius* se encuentran ampliamente distribuidos, presentes en todos los metagenomas estudiados con salinidades intermedias a altas (Figura 59A y 59B). Los representantes del género *Halonotius* constituyen hasta un 9 % de la población presente en ambientes acuáticos, concretamente en el estanque al 37 % de salinidad de las salinas de Santa Pola (Alicante) y hasta un 1,8 % en suelos salinos, como en el suelo hipersalino localizado en el Paraje Natural Marismas del Odiel (Huelva).

Estos datos confirman que el género *Halonotius* representa una parte importante de la población en los ambientes hipersalinos a altas salinidades (entre 19 y el 37 % de sales totales), encontrándose prácticamente ausentes a salinidades bajas. En este sentido, desde un punto de vista ecológico, podemos considerar al género *Halonotius* como una auténtica arquea halófila extrema, que se encuentra adaptada a condiciones de salinidad elevadas.

Con el fin de determinar la abundancia concreta de cada una de las cepas aisladas durante este trabajo, se realizaron reclutamientos de los genomas de las cepas F13-13^T, F15B^T y F9-27^T frente a las mismas bases de datos metagenómicas empleadas para determinar el porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S (ver Tabla 9 de Material y Métodos). En la Figura 59C-H se representan los reclutamientos obtenidos más significativos. Todas las cepas de *Halonotius* estudiadas exhibieron reclutamientos altos frente al ambiente del que habían sido aisladas: el metagenoma procedente del suelo hipersalino de las Marismas del Odiel (SMO2) para la cepa F15B^T y las salinas de Isla Cristina (IC21) para las cepas F9-27^T y F13-13^T, siendo ésta última especialmente más abundante. Sorprendentemente, los reclutamientos más altos de estas cepas se obtuvieron frente a un metagenoma de un lago hipersalino localizado en Rumania (S7), corroborando así tanto la abundancia de este género en ambientes hipersalinos como su amplia distribución mundial.

Sin embargo, a pesar del alto porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S identificadas en el metagenoma al 37 % procedente de las salinas de Santa Pola (SS37), no se obtuvieron reclutamientos significativos para estas cepas en este hábitat concreto (Figuras 60A-C). Aparentemente, sólo *Halonotius pteroides* parecía estar presente en este metagenoma (Figura 60D). La abundancia de secuencias por debajo del 95 %, así como el elevado porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S mencionado anteriormente relacionadas con *Halonotius*, hace pensar de la existencia de otras especies de este género presentes en este hábitat, no aisladas hasta la fecha.

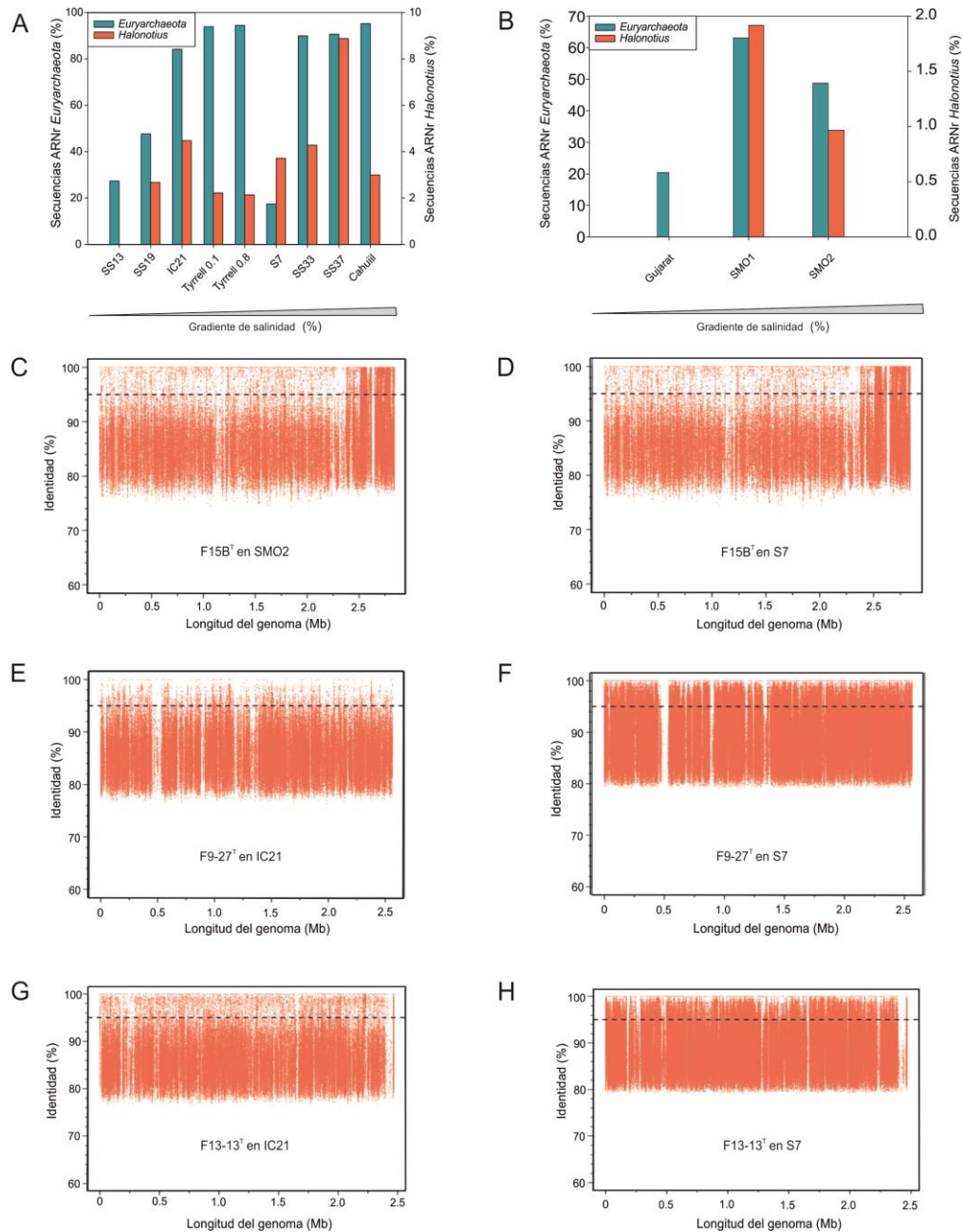


Figura 59. Abundancia de *Halonotus*. (A,B) Porcentaje de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas con *Euryarchaeota* y *Halonotus*. Los metagenomas aparecen ordenados por gradiente de salinidad. (C-H) Reclutamientos de los genomas de las cepas F15B^T, F9-27^T y F13-13^T frente a distintos metagenomas. Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de *read* ≥30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie.

Abreviaciones: SS13 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 13 % salinidad, SS19 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 19 % salinidad, IC21 - Metagenoma de las salinas de Isla Cristina (Huelva), 21 % salinidad, Tyrrell 0.1 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, Tyrrell 0.8 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, S7 - Metagenoma del lago Fara Fund (Rumania), 30 % salinidad, SS33 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 33 % salinidad, SS37 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 37 % salinidad, Cahuill - Metagenoma de la laguna Cahuill (Chile), 34 % salinidad, Gujarat - Metagenoma de suelo hipersalino de "Little Rann of Kutch" (Gujarat, India), SMO1 - Metagenoma de suelo hipersalino de las Marismas del Odiel (Huelva), 24 mS/cm salinity, SMO2 - Metagenoma de suelo hipersalino de las Marismas del Odiel (Huelva), 54 mS/cm salinity.

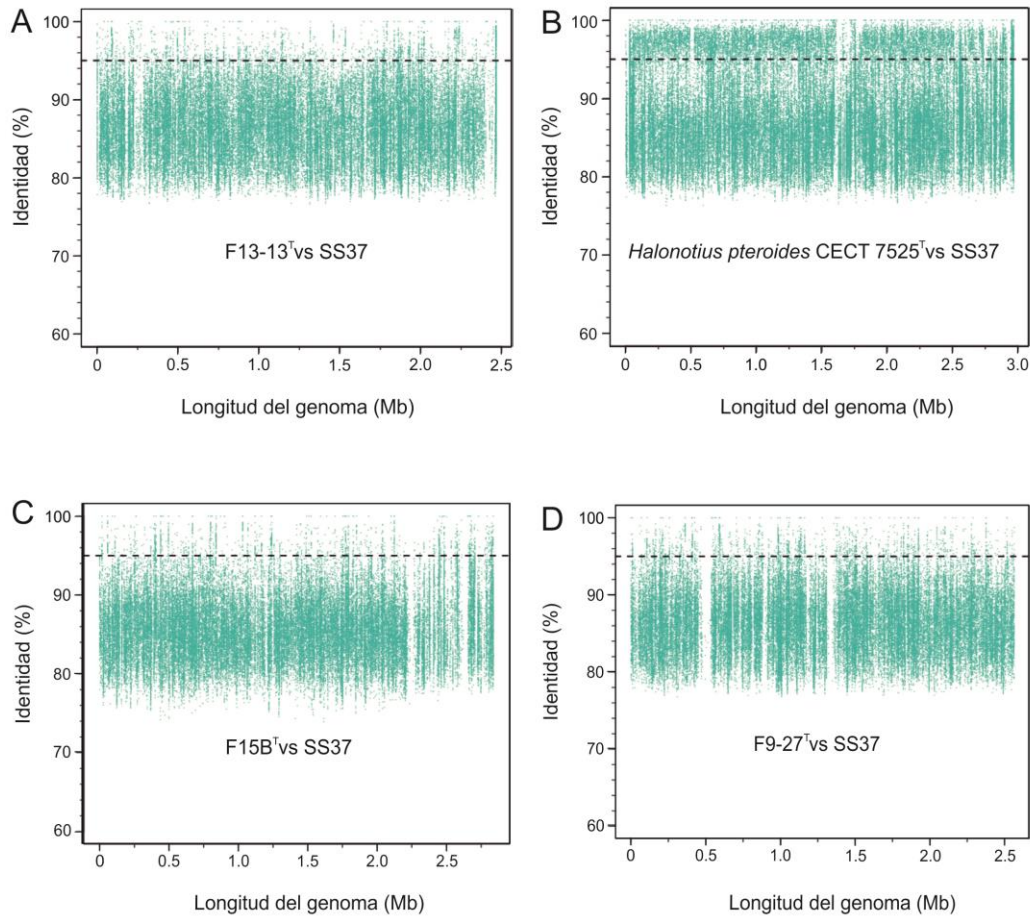


Figura 60. Reclutamientos de los genomas de las cepas F13-13^T, *Halonotius pteroides* CECT 7525^T, F15B^T, F9-27^T y frente al metagenoma SS37. Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de *read* ≥30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie.

Adicionalmente, para evaluar la distribución mundial de *Halonotius*, se realizó una búsqueda de secuencias del gen ARNr 16S relacionadas con este género en la base de datos SILVA. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 61, donde se aprecia la presencia de secuencias relacionadas con el género *Halonotius* en una gran variedad de ambientes hipersalinos de diferentes países como Canadá, Estados Unidos, Bolivia, Túnez, España, Rumanía, Turquía, Rusia, China o Australia. Estos datos confirman la extensa distribución global del género *Halonotius*.



Figura 61. Distribución global de las secuencias del gen ARNr 16S. Los círculos de colores muestran los puntos donde se han localizado secuencias de *Halonotius*, según la base de datos de SILVA. La flecha señala el lugar de donde se aislaron las cepas descritas en este trabajo. La circunferencia negra en Australia representa el sitio de donde se han extraído los genomas ambientales (MAGs) de *Halonotius*.

IV.3.III.II. Metabolismo

Por otra parte, en esta Tesis Doctoral se ha estudiado en detalle el metabolismo de las especies del género *Halonotius*, lo que ha permitido llevar a cabo una reconstrucción metabólica de los genomas de las especies de este género, que se muestran en la Figura 62.

Las cepas de *Halonotius* descritas en esta Tesis Doctoral se aislaron en medios complejos diseñados para el crecimiento de microorganismos aerobios heterótrofos (ver apartado III.2. de Material y Métodos). El estudio de la anotación de estos genomas confirma su metabolismo heterotrófico; además, indica que estos microorganismos carecen de capacidad para desarrollar una actividad fotosintética o quimiolitotrófica. De acuerdo con su naturaleza heterótrofa, se han identificado una gran cantidad de transportadores ABC *et al.*, que permiten la captación de carbohidratos, constituyendo además una gran fracción de los genes encontrados en los genomas de *Halonotius*.

Se ha identificado la presencia de genes representativos del metabolismo de carbohidratos, como los del ciclo de Krebs, la ruta de las pentosas fosfato, gluconeogénesis o la ruta Entner-Doudoroff. En lo relativo al proceso de oxidación de piruvato a Acetil-CoA, sólo se han encontrado los genes *porA* y *porB*, pertenecientes a la parte anaeróbica de la ruta, vía piruvato ferredoxina oxidoreductasa; mientras que la

parte aeróbica, mediada por la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), parece ausente. Asimismo, se han encontrado genes codificantes de una enzima α -amilasa (K21574), capaz de descomponer carbohidratos complejos en glucosa. Cabe destacar que, en concordancia con estudios previos sobre el metabolismo en haloarqueas (Falb et al., 2008; Anderson et al., 2011) la ruta clásica de glicólisis, Embden-Meyerhof, aparece incompleta, ya que carece de la enzima clave de la vía, la 6-fosfofructoquinasa. Esto sugiere que las haloarqueas utilicen de forma alternativa para la degradación de la glucosa otras enzimas que pudieran participar en este paso o la ruta Entner-Doudoroff.

Con respecto al metabolismo del nitrógeno, como se ha mencionado anteriormente, existen diferentes procesos que permiten llegar a obtener ion amonio. En concreto, en los genomas de *Halonotius* se han identificado los genes esenciales implicados en la reducción de nitrato por la vía asimilatoria, que codifican las enzimas nitrato y nitrito reductasa, las cuáles reducen el nitrato a nitrito y éste a su vez a ion amonio, que será incorporado al metabolismo central para la biosíntesis de compuestos nitrogenados. Este proceso de asimilación del amonio tiene lugar mediante la formación de glutamato por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa, para las cuáles también se han encontrado genes codificantes en los genomas de *Halonotius*. La presencia de un *antiporter* para la captación de nitrato-nitrito perteneciente a la superfamilia principal de transportadores facilitadores (MFS), así como, la del transportador Amt, implicado en el transporte de amonio/amoniaco, también ha sido identificada en estos genomas.

Adicionalmente, en los genomas de *Halonotius* se han encontrado otros genes codificantes de transportadores, concretamente varios del tipo ABC, implicados en la captación de diferentes compuestos orgánicos que pueden servir como fuente de nitrógeno, como aminoácidos de cadena ramificada, urea, taurina, poliaminas de tipo putrescina o diaminas de tipo espermidina. Además, se han identificado otros genes capaces de proporcionar compuestos ricos en nitrógeno mediante la degradación de aminoácidos, como el gen codificante de la enzima glutamato deshidrogenasa, que degrada el glutamato en amonio, generando NADPH; o por degradación de la urea (sólo ausente en *Halonotius terrestris* F15B^T). También se ha encontrado en dichos genomas la mayor parte de las rutas de síntesis de aminoácidos.

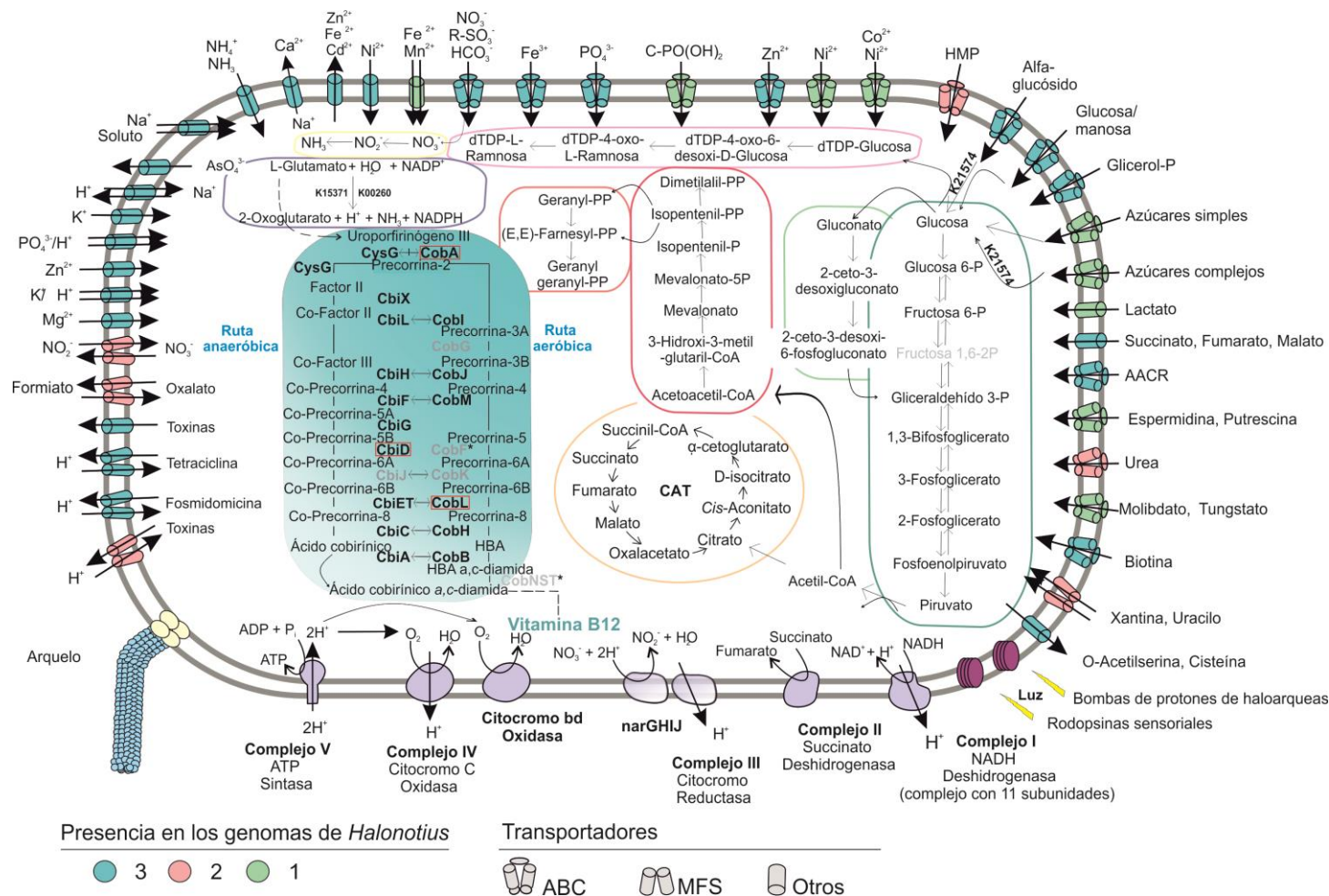


Figura 62. Reconstrucción metabólica de las cepas aisladas *Halonotius* sp. F13-13^T, *Halonotius* sp. F15B^T y *Halonotius* sp. F9-27^T. El panel turquesa representa la ruta de síntesis de la vitamina B₁₂ simplificada, en negrita se han representado los nombres de los genes presentes en los genomas, en gris los ausentes en arqueas y rodeados por un cuadrado rojo los ausentes en los genomas estudiados. Las flechas horizontales indican homología entre las rutas aerobia y anaerobia. Las líneas discontinuas corresponden a partes completas de la ruta no representadas en la figura. El recuadro verde oscuro representa la glicólisis (Embden-Meyerhof-Parnas), mientras que el verde claro la ruta Entner-Doudoroff modificada para haloarqueas. El color naranja representa el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el rosa la síntesis de isoprenos: isoprenos C5 (naranja oscuro) e isoprenos C10-C20 (naranja claro). El recuadro violeta claro corresponde con la biosíntesis de dTDP-L-ramnosa, el color amarillo refleja la ruta asimilatoria para la reducción de los nitratos, el violeta oscuro la degradación de L-glutamato por la enzima glutamato deshidrogenasa (*GdhA*). La enzima alfa-amilasa para la degradación de la glucosa también ha sido representada con su número KO.

Abreviaciones: AACR-aminoácidos de cadena ramificada; HMP-hidroximetilpirimidina; CAT-ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

El fósforo (fosfato) constituye un componente indispensable para el desarrollo de la vida y las funciones celulares. La presencia del transportador de alta afinidad de fosfato *PstSCAB*, en los genomas de *Halonotius* estudiados, sugiere que este sea la manera en la que el fosfato inorgánico es incorporado mayoritariamente en la célula. Del mismo modo, todos los genomas contienen un tipo de transportador ABC de alta afinidad (*PhnCDE*) para la captación de fosfonatos, compuestos organofosforados, que pueden servir como fuente nutricional de fósforo ante la escasez de fosfatos (Villarreal-Chiu et al., 2012).

En estos genomas además, se han encontrado diversos transportadores de compuestos antimicrobianos y compuestos tóxicos, así como la presencia de genes codificantes de arqueos.

IV.3.III.III. Biosíntesis de cobalamina (vitamina B₁₂)

El exhaustivo estudio de las rutas metabólicas en los genomas de las especies del género *Halonotius* puso de manifiesto la presencia del conjunto de genes implicados en la ruta completa para la síntesis de la vitamina B₁₂, lo que señala la capacidad genética de los representantes de este género para su síntesis *de novo*. Estos resultados se muestran en las Figuras 62 y 63. La cobalamina o vitamina B₁₂ es un metabolito complejo y un cofactor esencial indispensable para la vida, capaz de ser sintetizado sólo por un reducido número de microorganismos.

La ruta de síntesis de cobalamina es una de las rutas metabólicas más complejas y arcaicas que se conocen (Raux et al., 1999). Se trata de un proceso complicado en el que están involucradas más de 20 reacciones enzimáticas; comienza a partir del intermediario uroporfirinógeno III y consta de una parte aeróbica y otra anaeróbica. Aunque la mayoría de las enzimas implicadas son homólogas y pueden participar en ambas vías, unas pocas son específicas y pueden definirse como dependientes de oxígeno o sensibles a él (Moore & Warren, 2012).

La compleja estructura de la molécula de cobalamina, así como el alto coste metabólico que supone su síntesis (Morris, 2012; Doxey et al., 2015), hace que el número de microorganismos capaces de biosintetizarla sea muy limitado. Esto ha conducido en los microorganismos a una drástica disminución de la maquinaria genética implicada en su biosíntesis, y por consiguiente, a la denominación de aquellos capaces de producirla como “perdedores” que juegan la función de la Reina Negra (Morris, 2015). Este término, hace referencia a un juego de cartas en el que los jugadores tratan de evitar que la carta correspondiente a la “reina de picas” caiga en sus manos, y ha sido utilizado para describir

el beneficio adquirido por algunos microorganismos gracias a la pérdida de genes o funciones metabólicamente costosas. Estos microorganismos, los “ganadores” del juego, se beneficiarían así de esa reducción del contenido genómico, y por ende, de los bienes que otros, los “perdedores”, producen y luego aportan a la comunidad microbiana.

Hasta la fecha, apenas se ha estudiado el papel que juegan los miembros del dominio *Archaea* en la síntesis de cobalamina, limitado sólo a unos pocos representantes de *Thaumarchaeota*, halófilos de tipo *Crenarchaeota* y algunos *Euryarchaeota* metanógenos marinos (Rodionov et al., 2003; Doxey et al., 2015). Es por eso que la presencia de esta ruta y la capacidad de síntesis de este compuesto por parte de los miembros del género *Halonotius*, resulta de gran relevancia en los ambientes hipersalinos.

Concretamente, los genomas de *Halonotius* contienen casi todos los genes implicados en la parte tanto aerobia como anaerobia de la ruta, con sólo algunas pequeñas ausencias; por ejemplo, no se han encontrado los genes *CobG* y *CobK* pertenecientes a la parte aeróbica, ni tampoco *CbiD* y *CbiJ*, correspondientes a la anaeróbica (Figura 62). Asimismo, también se encontraron en estos genomas todos los genes que participan en la conversión de ácido cobirínico *a,c*-diamina hasta vitamina B₁₂ (Figura 63) y se representan como una línea discontinúa en el mapa metabólico (Figura 62). Cabe destacar que ninguno de estos genes, ausentes en los genomas del género *Halonotius*, se han detectado en ninguna otra arquea productora de cobalamina, y por tanto, no deben de ser considerados como indispensables en esta ruta (Doxey et al., 2015). Del mismo modo, estudios previos sugieren la presencia en un microorganismo de los genes *CbiA/CobB*, *CbiC/CobH* o *CobT*, como factores indicativos de la existencia de la ruta completa (Bertrand et al., 2011).

Hasta la fecha, a excepción de un estudio previo en *Halobacterium salinarum* NRC-1 (Woodson et al., 2003), ninguna otra haloarquea ha sido identificada como productora de cobalamina, y lo que se conoce al respecto en los ambientes hipersalinos y en las arqueas halófilas en general es muy limitado. Es por eso que, la presencia de todo el conjunto de genes implicados en la ruta de síntesis de este compuesto, así como la gran abundancia de miembros del género *Halonotius* y su extensa distribución en los ambientes hipersalinos, como se ha descrito en el apartado anterior, sugieren que este género desempeñe un papel clave en el desarrollo de las comunidades microbianas de estos ambientes, contribuyendo al aporte de cobalamina y al equilibrio de las interacciones tróficas.

Estos resultados han sido confirmados por la presencia en las bases de datos metagenómicas en las que *Halonotius* constituye un porcentaje representativo de la población, de enzimas relacionadas dependientes de la vitamina B₁₂ (metilmalonil-CoA mutasas, *methH*, MTR 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasas, *nrdA/nrdE* ribonucleósido-difosfato reductasas, *pduC* propanodiol dehidratasas, etc), indicando la presencia de dependencias metabólicas entre los proveedores y consumidores de cobalamina.

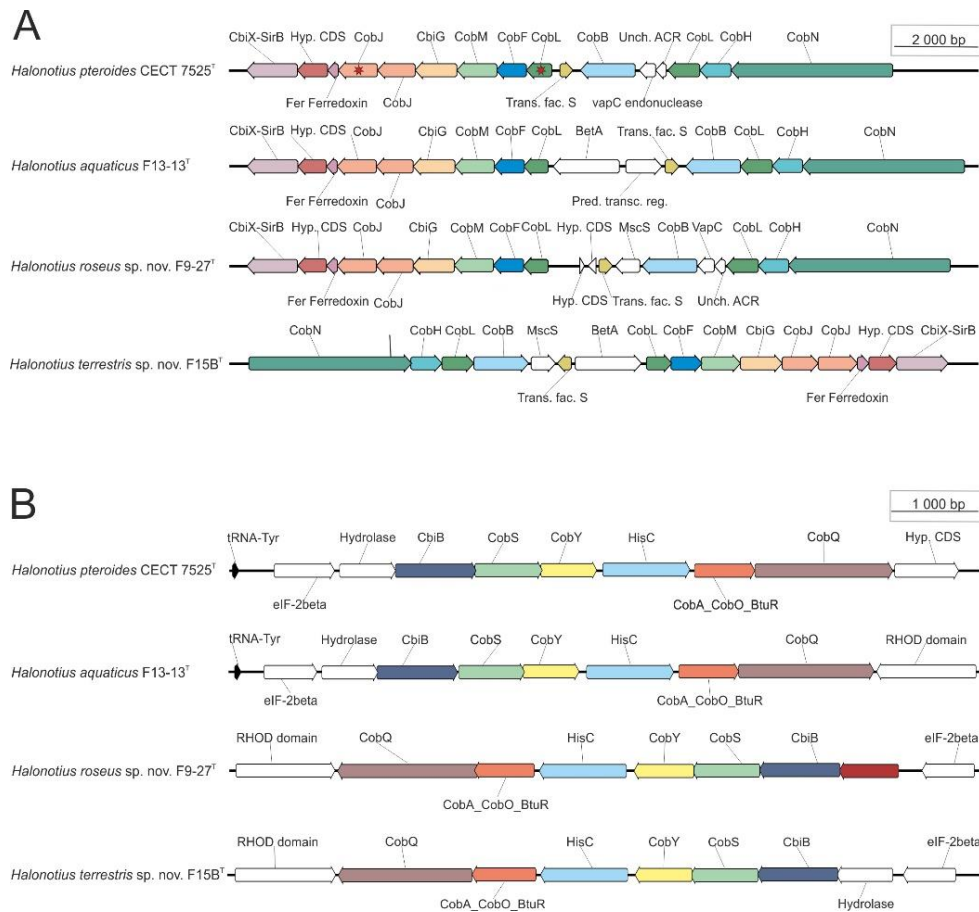


Figura 63. Comparación del *cluster* de genes de los genomas de *Halonotius* (n=4) implicados en la síntesis de cobalamina. **A)** Representación de los genes implicados en la primera parte de la ruta, desde uroporfirinógeno III hasta α ,c-diamina. **B)** Representación de los genes implicados en la segunda parte de la ruta, desde α ,c-diamina hasta vitamina B₁₂. Las estrellas rojas muestran los genes que presentan dos copias. En blanco se han representado los genes no conservados en el *cluster*. La escala indica la longitud del gen en pb.

IV.3.III.IV. Osmorregulación

Por otra parte, se han estudiado las estrategias de osmoadaptación que presentan los miembros del género *Halonotius* frente a los ambientes hipersalinos. Como se ha mencionado anteriormente, las estrategias de adaptación de los microorganismos halófilos a los cambios de salinidad del ambiente son muy diversas, aunque fundamentalmente se clasifican en estrategias *salt-in* y *salt-out* (Galinski & Trüper, 1994; Wood et al., 2001), las cuáles no son excluyentes entre sí (Deole et al., 2013; Youssef et al., 2014).

Mientras que los microorganismos con estrategia *salt-in* se caracterizan por acumular elevadas concentraciones de iones inorgánicos en el interior celular, los microorganismos con estrategia *salt-out* los expulsan en la medida de lo posible al exterior y en cambio, acumulan diferentes compuestos orgánicos que actúan como solutos compatibles (Empadinhas & Da Costa, 2008; Gunde-Cimerman et al., 2018).

Hemos caracterizado el proteoma de los miembros del género *Halonotius* con el objetivo de analizar el carácter ácido de sus proteínas (Figura 64) y lo hemos comparado con el de otras especies microbianas con estrategia *salt-in*, como las arqueas halófilas *Haloquadratum walsbyi* HBSQ00 (Bolhuis et al., 2006) y *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137^T (Becker et al., 2014), la bacteria halófila *Salinibacter ruber* DSM 13855^T (Mongodin et al., 2005) y con el de la bacteria halófila con estrategia *salt-out*, *Spiribacter salinus* M19-40^T (López-Pérez et al., 2013).

Los resultados obtenidos muestran la presencia principalmente de un único pico alrededor de un PI de 4,0 para todos los genomas de haloarqueas y para la bacteria *Salinibacter ruber* DSM 13855^T, y de un pequeño pico apenas perceptible en torno a un PI de 10,0 (PI), lo que indica una predominancia mayoritaria de residuos ácidos frente a básicos, sugiriendo así una estrategia de tipo *salt-in* por parte de los representantes del género *Halonotius*. Sólo *Spiribacter salinus* M19-40^T, el microorganismo que emplea la estrategia *salt-out*, mostró un pico diferente al resto, en torno a un PI de 4,5.

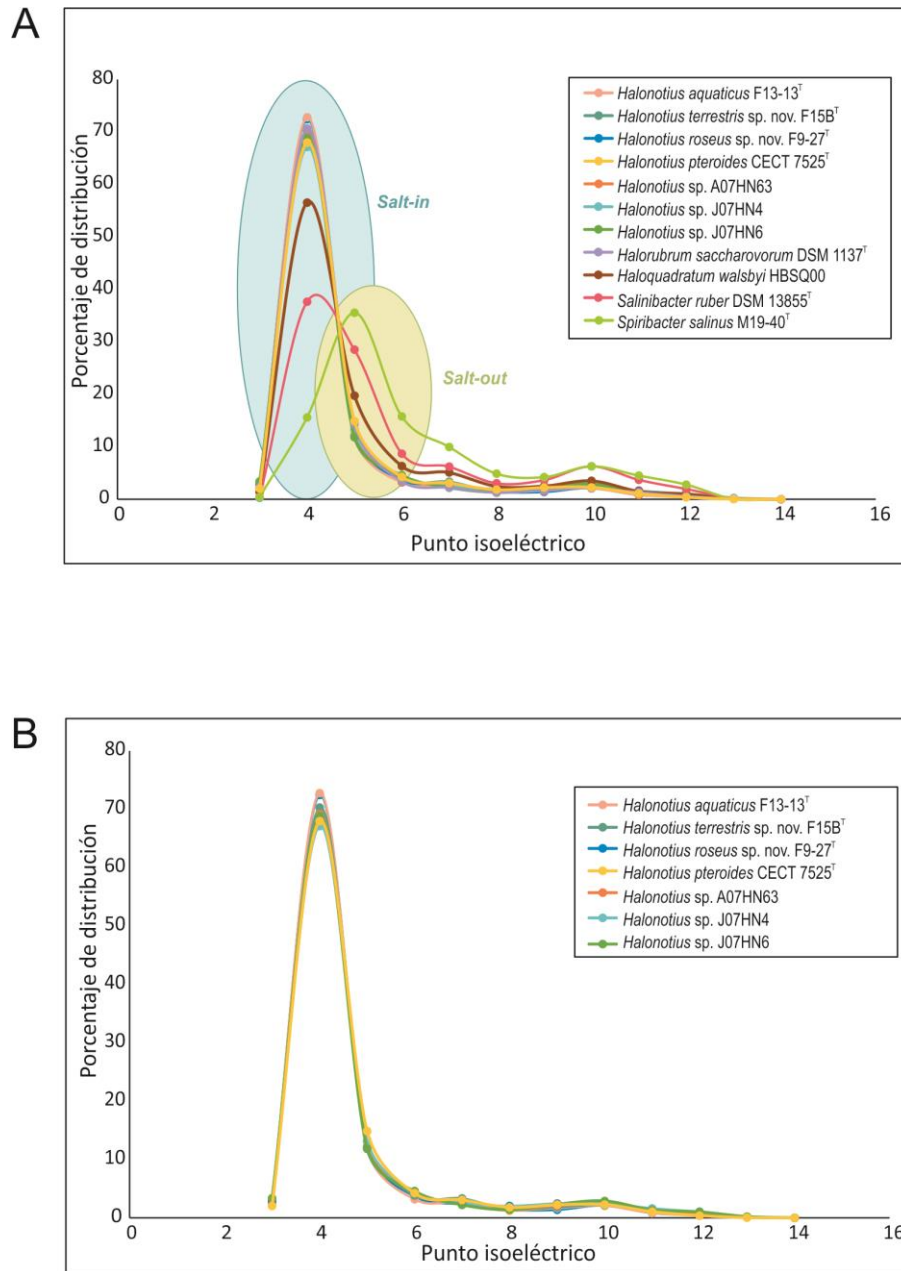


Figura 64. A) Comparación del perfil isoelectrico del proteoma de las especies de *Halonotius* y el de otros procariotas, calculado para cada genoma traducido y mostrado como porcentaje de distribución. B) Comparación del perfil isoelectrico del proteoma de las especies de *Halonotius* cultivadas y de las secuencias ambientales de *Halonotius*, calculado para cada genoma traducido y mostrado como porcentaje de distribución.

Otro método para evaluar la adaptación a la salinidad de los microorganismos, es a través del gradiente activo de sodio (Na^+) para la incorporación de nutrientes en la célula (Oren, 2011; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). Todos los genomas de *Halonotius* presentaron varios transportadores secundarios que catalizan el movimiento de solutos a través de la membrana utilizando el gradiente electroquímico de iones (Figura 62). El ión Na^+ es expulsado de la célula por los sistemas antiportadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, mientras que por el contrario, el potasio es incorporado en la medida de lo posible al interior, bien pasivamente mediante los canales de K^+ o por los sistemas simportadores K^+/H^+ (Figura 62), lo que nuevamente coincide con la estrategia de adaptación de tipo *salt-in*. La energía necesaria para llevarlo a cabo es generada por la cadena respiratoria de electrones y por las bombas de rodopsinas dependientes de la luz.

Por el contrario, en lo referente a la estrategia *salt-out*, no se ha encontrado ningún transportador relacionado con la captación de solutos compatibles, ni de tipo ABC, ni de cualquier otro tipo, en los genomas de *Halonotius*. Tampoco se ha identificado en estos genomas ninguna de las enzimas claves relacionadas con la síntesis de solutos compatibles del tipo glicina-betaína, ectoína, hidroxiectoína, prolina, bifosfoglicerato o trealosa, lo que sugiere que los miembros del género *Halonotius* no utilizan la estrategia *salt-out* como mecanismo de adaptación a los cambios de salinidades del ambiente.

IV.3.III.V. Estudio de las rodopsinas

Finalmente, se ha realizado un análisis de la presencia de secuencias de rodopsinas en los genomas de *Halonotius*. Como ya se ha mencionado, las rodopsinas son un grupo de proteínas foto-reactivas que se caracterizan por presentar una estructura común constituida por siete hélices transmembrana (Sharma *et al.*, 2007).

Las rodopsinas se identificaron por primera vez en haloarqueas en el año 1971 (Oesterhelt & Stoeckenius, 1971) y se encuentran ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida. Se caracterizan por su versatilidad y diversidad de funciones, las cuáles pueden definirse como a) fototransductores de energía o bombas de iones mediadas por la luz, que convierten la luz en potencial electroquímico para suministrar energía a las células mediante el transporte activo de protones al exterior; y b) receptores fotosensoriales, los cuales utilizan la luz para ganar información medioambiental y regular así procesos celulares (Govorunova *et al.*, 2017).

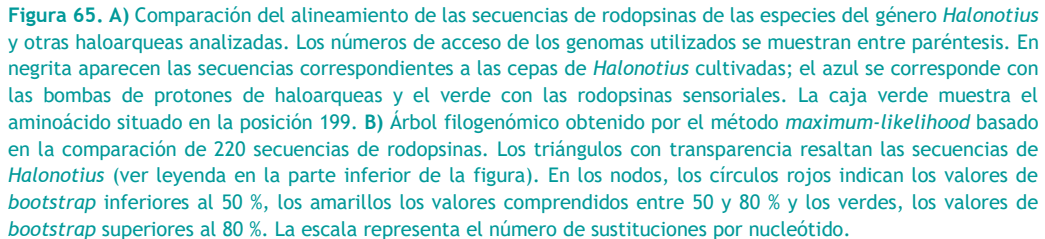
El análisis genómico de las especies del género *Halonotius* nos ha permitido localizar varias secuencias codificantes de rodopsinas en estos genomas (Figura 65B). Concretamente, las cuatro especies de *Halonotius* poseen bombas de protones de haloarqueas, lo que señala que la síntesis de ATP mediada por la luz es una característica típica de las especies de este género. Esto no es de extrañar e indica su adaptación a los ambientes hipersalinos, los cuales están expuestos directamente a la luz.

Como ya se ha indicado, estudios metagenómicos en diferentes ambientes hipersalinos, como las salinas de Santa Pola (Alicante) (Ghai et al., 2011; Fernández et al., 2014a), las salinas de Isla Cristina (Huelva) (Fernández et al., 2014b) o los suelos hipersalinos de las Marismas del Odiel (Huelva) (Vera-Gargallo & Ventosa, 2018), han puesto de manifiesto la presencia de numerosos genes codificantes de los distintos tipos de rodopsinas, sugiriendo que la luz es ampliamente utilizada en estos ambientes.

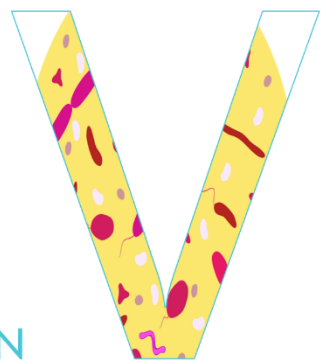
Además, las especies *Halonotius aquaticus* F13-13^T y *Halonotius terrestris* F15B^T también codifican rodopsinas sensoriales, lo que sugiere una mayor plasticidad metabólica en condiciones de luz para estas especies.

Por otro lado, las rodopsinas pueden clasificarse en función de la longitud de onda a la que absorben, en absorbentes de verde o absorbentes de azul. Este factor viene determinado por un único residuo aminoacídico, mientras que leucina (L) y metionina (M) absorben, mayoritariamente en la longitud de onda del verde, la glutamina (Q) lo hace en el azul (Man et al., 2003).

La Figura 65A muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los genes de las rodopsinas de los genomas de las especies de *Halonotius* y otras especies de haloarqueas. Los resultados indican que las rodopsinas presentes en las especies del género *Halonotius* absorben mayoritariamente en el espectro de la luz verde, ya que, como se puede observar, el aminoácido leucina es el que está presente en la posición 199 del alineamiento.



RESUMEN



El presente estudio se ha centrado en la caracterización, mediante técnicas dependientes de cultivo, de las comunidades microbianas de diferentes ambientes hipersalinos localizados en la provincia de Huelva, concretamente en las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta y en suelos hipersalinos de las Marismas del Odiel. El principal objetivo ha sido el aislamiento de nuevas arqueas y bacterias halófilas a partir de estos ambientes, que a su vez, pudieran representar una fracción importante de la microbiota halófila que allí habita. Por otro lado, hemos realizado la descripción de estos nuevos grupos aislados que representan nuevos taxones y estudios genómicos comparativos de algunos de los grupos caracterizados de mayor interés.

Para ello, en primer lugar, se obtuvieron un total de 35 muestras de los citados parajes en diferentes períodos (septiembre de 2014 y junio de 2016), las cuales se inocularon empleando diferentes medios y condiciones de cultivo diseñados con este fin. Tras varios meses de esfuerzo y sucesivas resiembras, se consiguió obtener en cultivo puro más de 2000 cepas microbianas. En total, tras la secuenciación parcial del gen ARNr 16S de estas cepas aisladas y su comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos, se identificaron 254 cepas que se clasificaron en 24 géneros diferentes, con porcentajes de semejanza que oscilan entre 86,8 % y 99,9 %. De ellas, 209 corresponden a cepas de haloarqueas y 45 a cepas de bacterias halófilas, pertenecientes a 16 y 8 géneros distintos, respectivamente. Los resultados obtenidos se compararon con los de estudios metagenómicos previos llevados a cabo en estos mismos ambientes, con el objetivo de identificar si las mejoras en la metodología de cultivo permitían la identificación de grupos mayoritarios comunes en ambos estudios. La mayor parte de las arqueas aisladas de las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta pertenecían a los géneros *Halorubrum* y *Natronomonas*, predominantes también en estos ambientes según datos metagenómicos, mientras que en lo referente a las bacterias, *Salinibacter* era el único género compartido entre ambos estudios. Por otro lado, en las muestras de suelo de las Marismas del Odiel, *Haloarcula* y *Halorubrum* fueron los géneros más frecuentemente aislados, coincidentes a su vez con los estudios metagenómicos previos. Ambos estudios difieren en lo que a grupos minoritarios se refiere. Destaca en el caso concreto de las muestras de suelo, donde a pesar de que ninguna bacteria pudo ser identificada mediante medios dependientes de cultivo, la diversidad obtenida a nivel de género fue mucho mayor a la de los ambientes acuáticos, resultados también en concordancia con los análisis metagenómicos. Estos datos indican que la metodología seguida en esta Tesis Doctoral ha permitido el aislamiento de los principales grupos de microorganismos que habitan en los ambientes hipersalinos estudiados.

En segundo lugar, se llevó a cabo un cribado del total de cepas identificadas, seleccionándose aquellas cuyos porcentajes de semejanza correspondientes a la secuenciación parcial del gen ARNr 16S fueron inferiores al 97-98 % o al 95 %, ante la posibilidad de que pudieran constituir nuevas especies o incluso nuevos géneros microbianos, respectivamente. Se trataba concretamente de 30 cepas, las cuales nuevamente se amplificaron por PCR y se secuenciaron para obtener las secuencias casi completas de este gen. En este caso, los porcentajes de semejanza obtenidos tras su comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos resultaron comprendidos entre 86,2 % y 97,9 % con respecto a las especies descritas anteriormente pertenecientes a diversos géneros de procariotas, tanto de arqueas como de bacterias halófilas.

Algunos de estos nuevos grupos han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral mediante la realización de un análisis taxogenómico, que engloba la metodología clásicamente empleada para la descripción de especies procariotas (determinación de las características filogenéticas, genotípicas, fenotípicas y quimiotaxonómicas), así como el análisis bioinformático de los genomas de estos nuevos taxones a describir (determinación de su posición filogenómica y el cálculo de los parámetros genómicos Identidad Nucleotídica Media [ANI, *Average Nucleotide Identity*], Identidad Aminoacídica Media [AAI, *Average Amino acid Identity*] e hibridación ADN-ADN *in silico* [DDH]), tal y como requiere la actual taxonomía de procariotas. Dicho estudio ha permitido la descripción de dos nuevos géneros de haloarqueas, pertenecientes a los órdenes *Halobacteriales* y *Haloferacales*, *Haloglomus* gen. nov. y *Halosegnis* gen. nov., respectivamente, así como, ocho nuevas especies designadas como *Halorientalis pallida* sp. nov., *Natronomonas salsuginis* sp. nov., *Haloglomus irregulare* sp. nov., *Halosegnis longus* sp. nov., *Halosegnis rubeus* sp. nov., *Halonotius aquaticus* sp. nov., *Halonotius terrestris* sp. nov. y *Halonotius roseus* sp. nov.

Con el propósito de comprobar si tal y como nos habíamos propuesto, algunos de estos grupos eran realmente abundantes en los ambientes hipersalinos estudiados y para poder adquirir un conocimiento más detallado sobre su organización genómica, fisiología y metabolismo, realizamos estudios de ecología microbiana y de genómica comparativa de aquellos grupos descritos de especial interés.

Los estudios ecológicos sobre el nuevo género *Haloglomus*, basados en reclutamientos genómicos, han permitido determinar su distribución y abundancia global. La especie del género *Haloglomus* descrita en esta Tesis Doctoral, ha sido identificada en diferentes puntos del planeta, como Australia, España, Irán o Rumania, confirmando así su amplia

localización geográfica. Además, la presencia de representantes de este género en estos ambientes hipersalinos, se incrementa con la salinidad, siendo especialmente abundante a salinidades altas (en torno al 30 %); la comparación de este hecho con sus requerimientos de crecimiento óptimo nos permite definir al género *Haloglomus* como una auténtica arquea halófila extrema. Los resultados obtenidos no parecen indicar que este género sea especialmente abundante en ninguna de las bases de datos analizadas; sin embargo, la abundancia de secuencias por debajo del 95 % de semejanza en dichas bases de datos sugiere la posibilidad de que existan otras especies relacionadas con este género no descritas hasta la fecha.

Por su parte, el estudio genómico detallado de las cepas que conforman el nuevo género *Halosegnis*, ha revelado que poseen un tamaño de genoma relativamente pequeño (entre 2,4 y 2,5 Mb), en comparación con el de las especies del orden *Halobacteriales*, un alto contenido en G+C (64,7 y 66,0 moles%) y la presencia de un único operón ribosómico, lo que podría estar relacionado con su adaptación al medio hipersalino. Durante el estudio del metabolismo de este nuevo género microbiano, se ha observado que presenta un estilo de vida heterotrófico, tal y como demuestra el elevado número de transportadores para la captación de carbohidratos, así como la presencia de las principales rutas relacionadas con los metabolismos del carbono y del nitrógeno. No se han encontrado evidencias de capacidades fotosintéticas ni quimiolitotróficas, ni tampoco rutas para la fijación de carbono. Además, en estos genomas se ha identificado el conjunto de genes codificantes de la ruta completa de síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA), sugiriendo así su posible potencial biotecnológico. Por otro lado, el análisis del proteoma de este nuevo grupo refleja una estrategia de osmoadaptación de tipo *salt-in* caracterizada por un punto isoelectrico bajo (alrededor de 4,0), una frecuencia de aminoácidos mayoritariamente ácidos (aspartato y glutamato) frente a los básicos (arginina y lisina) y varios transportadores secundarios para el intercambio de iones K^+ , Cl^- y Na^+ a través de la membrana. Asimismo, se han estudiado las rodopsinas presentes en los genomas de las especies del género *Halosegnis*. Este análisis ha revelado la presencia de bombas de protones de haloarqueas dentro de dicho grupo, lo que sugiere su capacidad de síntesis de ATP mediada por la luz en estas cepas.

Para evaluar la importancia ecológica del nuevo género *Halosegnis* en los ambientes hipersalinos, se determinó la abundancia de secuencias basada en el gen ARNr 16S en un total de 18 metagenomas de sistemas hipersalinos acuáticos de diferentes localizaciones geográficas y porcentaje de salinidad disponibles en las bases de datos. Los resultados obtenidos indican que los representantes de este género constituyen una proporción

importante de la población microbiana en estos ambientes, especialmente a salinidades intermedias, y que además se encuentran ampliamente distribuidos, identificándose en tres continentes diferentes (América, Asia y Europa) de los cuatro estudiados. Los reclutamientos genómicos de cada cepa frente a las mismas bases de datos metagenómicas empleadas corroboran estos resultados y además, reflejan que la nueva especie *Halosegnis rubeus* predomina en los ambientes hipersalinos estudiados, frente a *Halosegnis longus*.

Por último, el estudio genómico comparativo de las cepas pertenecientes a las cuatro especies del género *Halonotius* muestra que, como la mayoría de miembros pertenecientes a la clase *Halobacteria* (filo *Euryarchaeota*), estos presentan valores altos de contenido en G+C (entre 59,5 y 62,7 moles%), mientras que el tamaño genómico (2,5-3,0 Mb) se corresponde con el más pequeño descrito hasta la fecha para la familia *Halorubraceae*, en la cual se clasifican. Además, se ha determinado que este género presenta una típica estrategia *salt-in*, con un único pico alrededor de 4,0 (PI) y con la presencia de varios sistemas antiportadores que permiten la entrada de K^+ y Cl^- en la célula y la extrusión de Na^+ al medio. No se ha encontrado en estos genomas ninguna evidencia de estrategia de tipo *salt-out*. El análisis genómico del género *Halonotius* también nos ha permitido localizar varias secuencias codificantes de rodopsinas en estos genomas. Concretamente, bombas de protones de haloarqueas, lo que indica que la síntesis de ATP mediada por la luz es una característica típica de las especies de este género. Además, dos de las especies del género *Halonotius* también codifican rodopsinas sensoriales, sugiriendo una mayor plasticidad metabólica en condiciones de luz para las mismas.

La reconstrucción metabólica de los genomas del género *Halonotius* ha revelado la presencia de la ruta completa de síntesis de cobalamina (vitamina B_{12}). En base a esta capacidad, así como a la amplia distribución global de este género y a su abundancia en ambientes hipersalinos, postulamos que los miembros del género *Halonotius* desempeñan un papel esencial en las comunidades microbianas de estos ambientes a las que les proporcionan productos metabólicamente costosos, como la vitamina B_{12} .

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral confirman que tal y como nos habíamos propuesto inicialmente, se han conseguido aislar varios grupos de microorganismos abundantes en los ambientes hipersalinos hasta la fecha desconocidos. Asimismo, nos ha permitido obtener una visión más detallada de su organización genómica, requisito indispensable para entender cómo se comportan estos microorganismos en su ambiente natural.

SUMMARY



This PhD Thesis was focused on the characterization by culture-dependent studies of the microbial communities inhabiting different hypersaline environments from Huelva, such as Isla Cristina and Isla Bacuta salterns and hypersaline soils from Odiel Salt Marshes. The main objective of this study has been the isolation of new groups of halophilic archaea and bacteria from those habitats which indeed could represent a large fraction of the microbiota. On the other hand, we have carried out the description of these newly isolated groups as new taxa, and a comparative genomic study of the most interesting groups.

For this purpose, firstly, 35 samples from these locations were obtained in two periods (September 2014 and June 2016), and were inoculated using different media and culture conditions. After several months of efforts and successive subcultivations, more than 2000 microbial strains were obtained in pure culture. After 16S rRNA gene partial sequencing of these strains and its comparison with public databases, a total of 254 strains were successfully identified and classified in 24 different genera, with similarity percentages between 86.8 % and 99.9 %, from which 209 are haloarchaea and 45 bacteria, classified in 16 and 8 different genera, respectively. The obtained results were compared with previously metagenomic studies carried out in the same habitats to determine if improvements in culturing methodologies permitted the characterization of the major microbial groups in both studies. The main proportion of isolated archaea from Isla Cristina and Isla Bacuta salterns were related to the genera *Halorubrum* and *Natronomonas*, which were also determined as the predominant genera in those environments according to metagenomic data. In relation to bacteria, *Salinibacter* was the only genus shared by both studies. On the other side, *Haloarcula* and *Halorubrum* were the most frequently isolated genera from soil samples from Odiel Salt Marshes, which was also in agreement with previous metagenomic studies. However, our studies differed with respect to the minority microbial groups reported on the metagenomic analyses. Regarding soil samples, despite the fact any bacteria could be identified on the culture-dependent study, the diversity obtained at the genus level was much more higher than the one obtained in aquatic environments, also in concordance with metagenomics. These data proved that the methodology used in this PhD Thesis have allowed the isolation of the major microbial groups inhabiting the hypersaline systems studied.

Secondly, from the total isolated strains and according to partial 16S rRNA sequencing, a screening was performed. Facing the possibility that these strains might constitute new species or even new microbial genera, those whose percentages of similarity were under the cut-off value 97-98 % or 95 % were selected. These were 30 strains, which were again

amplified by PCR and sequenced to obtain the almost complete sequences of this gene. In this case, the percentages of similarity obtained after comparison with the sequences available in the databases, ranged between 86.2 % and 97.9 % with different archaeal and bacterial species previously described.

Some of these new groups have been studied in this Doctoral Thesis by taxogenomic analyses, which included the methodology classically used for the description of prokaryotic species (phylogenetic, genotypic, phenotypic and chemotaxonomic characterization), in conjunction with a bioinformatic analysis of their genomes (phylogenomic characterization and estimation of the genomic parameters Average Nucleotide Identity [ANI], Average Amino acidic Identity [AAI] and *in silico* DNA-DNA hybridization [DDH]), as required by the current taxonomy of prokaryotes. This analysis have permitted the description of two haloarchaeal genera, belonging to the orders *Halobacteriales* and *Haloferacales*, *Haloglomus* gen. nov. and *Halosegnis* gen. nov., respectively, as well as eight new haloarchaeal species designated as *Halorientalis pallida* sp. nov., *Natronomonas salsuginis* sp. nov., *Haloglomus irregulare* sp. nov., *Halosegnis longus* sp. nov., *Halosegnis rubeus* sp. nov., *Halonotius aquaticus* sp. nov., *Halonotius terrestris* sp. nov., and *Halonotius roseus* sp. nov.

In terms of verifying whether some of these groups, as we had proposed, were abundant in hypersaline environments, and in order to acquire a more detailed knowledge about their genomic organization, physiology and metabolism, ecological studies and comparative genomic analyses of the most interesting groups were performed.

Ecological studies on the new genus *Haloglomus* based on genomic recruitments, permitted to determine its global distribution and abundance. The species of the genus *Haloglomus* described in this Doctoral Thesis has been determined in different geographical locations, such as Australia, Spain, Iran or Romania, thus confirming their widespread distribution. In addition, the presence of members of this genus in these hypersaline environments increased with salinity, being especially abundant at high salinities (around 30%). This fact, together with its optimal growth requirements, allowed to define the genus *Haloglomus* as a real extremely halophilic archaeon. Although the results obtained do not indicate that this genus is especially abundant in any of the analyzed databases, the abundance of reads below 95 % similarity in these ecosystems suggests the possibility that there might be other species related to this genus not yet described to date.

Regarding the detailed genomic study of strains of the newly described genus *Halosegnis*, they have revealed a relative small genome size (between 2.4 and 2.5 Mb) among the smallest within the members of the order *Halobacteriales*, a high G+C content (64.7–66.0 mol%) and the presence of a single ribosomal operon per genome, which might be related to their adaptation to hypersaline environments. Metabolic insights into the novel taxa, indicated a heterotrophic lifestyle, supported by the large number of transporters for carbohydrates uptake found, as well as, by the presence of the main pathways involved in carbon and nitrogen metabolism. No signs of photosynthetic or chemolithotrophic capabilities were recognized and no carbon fixation pathways were detected. In addition, the complete biosynthesis pathway for γ -aminobutyric acid (GABA) has been discovered in these genomes, suggesting their possible potential in biotechnological applications. On the other hand, the analysis of the proteome of this new group pinpointed a *salt-in* osmoadaptation strategy, characterized by a low isoelectric point (around 4.0), the predominance of acidic amino acids (aspartate and glutamate) against basic ones (arginine and lysine) and by the presence of several secondary transporters for K^+ , Cl^- and Na^+ exchange across the membrane. The presence of rhodopsins in the genomes of the species of the genus *Halosegnis* have also been studied. Haloarchaea proton-pumps were recognized within this group, suggesting an ATP synthesis light-mediated for these strains.

To assess the ecological relevance of the new genus *Halosegnis* along hypersaline habitats, 16S rRNA reads-based abundance estimations were performed in a total of 18 aquatic hypersaline systems available from public databases (geographically remote and with contrasting salinities). The results indicated that representatives of this genus comprise an important proportion of the microbial population dwelling these environments, especially at intermediate salinities. Members of this genus are also widely distributed, identified in three different continents (America, Asia and Europe) among the four studied. Fragment recruitments of each specific strain against the same metagenomic databases corroborated these results, and furthermore, exhibited the predominance of the species *Halosegnis rubeus* against *Halosegnis longus* on these habitats.

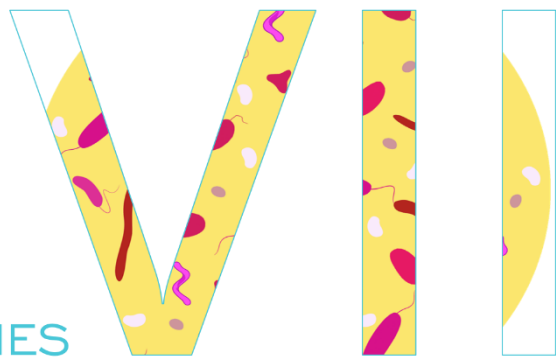
Finally, the comparative genomic study of strains belonging to the genus *Halonotius* depicted that, as most members of the class *Halobacteria* (phylum *Euryarchaeota*), all genomes had a high G+C content (between 59.5 and 62.7 mol%), whereas the genome size (2.5–3.0 Mb) represents the smallest one reported for the family *Halorubraceae*, in which they are included. Moreover, the presence of a single peak around 4.0 (IP) and the presence of several antiporter systems for K^+ and Cl^- uptake and for Na^+ extrusion,

demonstrated a typical *salt-in* strategy for these genomes. No evidencies of a *salt-out* strategy were distinguished. Genomic analyses of the genus *Halonotius* have also allowed the identification of several rhodopsin-like sequences in these genomes, more specifically, haloarchaeal proton-pumps, which designated that light-mediated ATP synthesis is a typical feature of species of this genus. Additionally, two of the species also encode sensory rhodopsins, suggesting metabolic flexibility in illuminated conditions for these two strains.

Genome-scale metabolic reconstructions of the genus *Halonotius* revealed that species of this genus encode all the necessary enzymatic reactions involved in cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis. Due to this fact and the widespread distribution and abundance of representatives of this genus in hypersaline environments, we hypothesize that its members perform a critical function by being able to provide “expensive” commodities to the halophilic microbial communities at large.

The results obtained on this PhD Thesis indicate that, according to the main purpose of this study, an abundant fraction of the microorganisms dwelling in hypersaline environments, which until date remained uncultured, were successfully isolated in pure culture and characterized. Besides, it permitted to gain a more detailed view about their genomic insights, essential requirement to understand how these microorganisms behave in their natural environments.

CONCLUSIONES



I. El estudio de la comunidad procariota en muestras de agua de diferentes estanques de las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta y en suelos hipersalinos de las Marismas del Odiel, todos ellos localizados en la provincia de Huelva, ha permitido, el aislamiento de más de 2000 cepas, de entre las cuales, tras su secuenciación parcial del gen ARNr 16S, se ha conseguido identificar un total de 254 cepas, correspondiendo 209 a haloarqueas y 45 a bacterias halófilas, lo que constituye un total de 24 géneros microbianos diferentes, de los cuales 16 géneros pertenecen al dominio *Archaea* y 8 al dominio *Bacteria*. La comparación de estos resultados con los descritos en estudios metagenómicos previos en estos mismos ambientes hipersalinos, coinciden en que son los géneros *Halorubrum*, *Natronomonas* y *Salinibacter* los más abundantes en las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta, si bien difieren en cuanto a otros grupos minoritarios. De forma similar, en lo que respecta a las muestras de suelos de las Marismas del Odiel, son los géneros *Haloarcula* y *Halorubrum* los mayoritarios en estos ambientes.

II. El estudio taxonómico polifásico basado en las características filogenéticas, fenotípicas, genotípicas y quimiotaxonómicas de las cepas F13-25^T y F20-122^T, aisladas de las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta, respectivamente, junto a la secuenciación de sus respectivos genomas, ha demostrado que estas cepas constituyen dos nuevas especies de haloarqueas de los géneros *Halorientalis* y *Natronomonas*, para las cuales proponemos los nombres de *Halorientalis pallida* sp. nov. y *Natronomonas salsuginis* sp. nov., respectivamente.

III. La caracterización taxogenómica de la cepa F16-60^T, aislada de muestras de agua de las salinas de Isla Cristina, ha permitido concluir que esta cepa constituye un nuevo género, con una única especie, perteneciente a la familia *Haloarculaceae*, para la cual proponemos la denominación de *Haloglomus irregulare* gen. nov., sp. nov. Los reclutamientos genómicos de esta cepa frente a diversas bases de datos metagenómicas de ambientes hipersalinos en diferentes puntos del planeta han puesto de manifiesto su presencia en hábitats con salinidades elevadas, en concordancia con su crecimiento óptimo y confirmando así su condición de arquea halófila extrema. Asimismo, aunque no podamos concluir que este género sea especialmente abundante en ninguna de las bases de datos estudiadas, sí que hemos determinado que se encuentra ampliamente distribuido a nivel global, localizado en diferentes zonas geográficas.

IV. Las cepas F12-1^T, F17-44^T, F18-79 y F19-13, aisladas a partir de estanques de las salinas de Isla Cristina e Isla Bacuta, se han caracterizado mediante técnicas clásicas y genómicas y los resultados confirman que se trata de un nuevo género dentro de la familia *Halobacteriaceae*, constituido por dos especies diferentes, para las cuales proponemos las designaciones de *Halosegnis* gen. nov., *Halosegnis longus* sp. nov. y *Halosegnis rubeus* sp. nov., respectivamente.

V. El porcentaje de secuencias relacionadas con el gen ARNr 16S en un total de 18 hábitats hipersalinos acuáticos ha demostrado la abundancia del género *Halosegnis*, especialmente en ambientes con salinidades intermedias, donde además se estima que conforma una proporción importante de la microbiota de estos ambientes. Asimismo, se concluye que los miembros de este género se encuentran ampliamente distribuidos, identificándose en América, Asia y Europa. Los reclutamientos genómicos reflejan que la nueva especie *Halosegnis rubeus* predomina en los ambientes hipersalinos estudiados, frente a *Halosegnis longus*.

VI. El análisis genómico comparativo de las especies del nuevo género *Halosegnis* refleja un metabolismo de vida de tipo heterotrófico, con la presencia de varios transportadores y las rutas principales relacionadas con los metabolismos del carbono y nitrógeno. También poseen la ruta completa de biosíntesis de ácido γ -aminobutírico (GABA), poniendo de manifiesto el potencial de este género en aplicaciones biotecnológicas. Por otro lado, las especies del género *Halosegnis* poseen un proteoma ácido con un punto isoeléctrico bajo, indicando que poseen una estrategia de osmorregulación de tipo *salt-in*. Además, la identificación de rodopsinas de tipo bomba de protones de haloarqueas en los genomas de las especies del género *Halosegnis*, sugiere la capacidad de estos microorganismos para utilizar la luz.

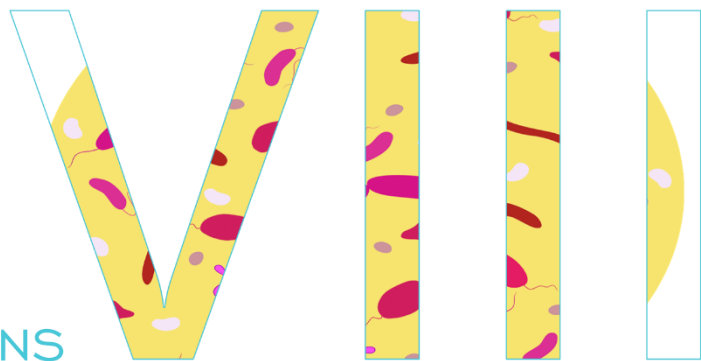
VII. A partir de diferentes muestras de agua de las salinas de Isla Cristina y de un suelo hipersalino de las Marismas del Odiel conseguimos aislar en cultivo puro tres cepas relacionadas con el género *Halonotius*, denominadas F13-13^T, F15B^T y F9-27^T. Los análisis filogenéticos y filogenómicos, la exhaustiva comparación de los perfiles lipídicos, la completa caracterización fenotípica, así como la determinación de los parámetros AAI, ANI y DDH de estas cepas han permitido su descripción como tres nuevas especies del género *Halonotius*, así como, la descripción corregida de este género. Las tres nuevas especies se han designado como *Halonotius aquaticus* sp. nov., *Halonotius terrestris* sp. nov. y *Halonotius roseus* sp. nov., respectivamente.

VIII. Las especies del género *Halonotius* se encuentran ampliamente distribuidas geográficamente en diferentes ambientes hipersalinos de Canadá, Estados Unidos, Bolivia, Túnez, España, Rumanía, Turquía, Rusia, China o Australia. Asimismo, entre los metagenomas estudiados, el género *Halonotius* representa una proporción importante de estos ambientes, constituyendo hasta un 9 % de la población en ambientes acuáticos y hasta un 1,8 % en suelos salinos, siendo especialmente abundante a altas salinidades (entre el 19 y el 37 % de sales totales).

IX. El estudio del proteoma de las especies del género *Halonotius* ha demostrado que poseen un mecanismo de osmoadaptación de tipo *salt-in*, caracterizado por un punto isoeléctrico bajo (alrededor de 4,0), así como por la presencia de varios transportadores secundarios que permiten la entrada de iones K^+ y Cl^- en la célula y la extrusión de Na^+ . El análisis de las rodopsinas por su parte, indica que la síntesis de ATP mediada por la luz es una característica típica de las especies de este género dada la presencia en todas ellas de bombas de protones de haloarqueas. Además, las especies *Halonotius aquaticus* y *Halonotius terrestris*, también codifican rodopsinas sensoriales, lo que sugiere una mayor plasticidad metabólica en condiciones de luz para estas especies.

X. El estudio detallado del metabolismo de las especies del género *Halonotius* ha revelado la presencia del conjunto de genes implicados en la ruta completa de síntesis de la vitamina B_{12} , lo que apoya la capacidad genética de este género para su síntesis *de novo*, hecho que posee una gran relevancia en los ambientes hipersalinos. Esta característica junto a la abundancia del género *Halonotius* y su extensa distribución en los ambientes hipersalinos, sugiere que los representantes de este género desempeñan un papel clave en las comunidades microbianas de estos hábitats extremos, contribuyendo al aporte de cobalamina y al equilibrio de las interacciones tróficas.

CONCLUSIONS



I. The study of the prokaryotic community from different hypersaline environments located in Huelva (Isla Cristina and Isla Bacuta salterns and hypersaline soils from Odiel Saltmarshes), by using different methodologies and culture conditions, have permitted the isolation of more than 2000 strains. On the basis of the partial 16S rRNA gene sequencing, 254 were successfully identified, from which 209 corresponded to haloarchaea and 45 to halophilic bacteria. In total we have identified 24 different genera, 16 of them affiliated to the phylum *Archaea* and 8 to the phylum *Bacteria*. The comparison of the culturable microbial diversity against previously described in these habitats by metagenomic approaches, agreed that representatives of the genera *Halorubrum*, *Natronomonas* and *Salinibacter* are the most abundant in Isla Cristina and Isla Bacuta saltern, although they differ with respect to the minority microbial groups. Similarly, regarding the samples from hypersaline soils from Odiel Saltmarshes, *Haloarcula* and *Halorubrum* are the most prevalent genera in that habitat.

II. The polyphasic taxonomic study based on the phylogenetic, phenotypic, genotypic and chemotaxonomic characteristics of strains F13-25^T and F20-122^T, isolated from Isla Cristina and Isla Bacuta salterns, respectively, together with their genomes's sequencing have revealed that these strains constitute two new haloarchaeal species of the genera *Halorientalis* and *Natronomonas*, for which the names *Halorientalis pallida* sp. nov. and *Natronomonas salsuginis* sp. nov., respectively, are proposed.

III. The taxogenomic characterization of strain F16-60^T, isolated from a water sample from Isla Cristina saltern, permitted to conclude that this strain constitute a new genus and a new species of the family *Haloarculaceae*, for which the designation *Haloglomerus irregulare* gen. nov., sp. nov. is proposed. Genomic recruitments of this strain against different hypersaline worldwide distributed metagenomic datasets have brought to light its presence at high salinities, in accordance with its optimal growth rate and thus, ratifying its condition of extremely halophilic archaeon. Moreover, although we cannot conclude the abundance of this genus in any of the studied datasets, we can corroborate its global worldwide distribution, present at different geographical locations.

IV. The strains F12-1^T, F17-44^T, F18-79 and F19-13, isolated from ponds of Isla Cristina and Isla Bacuta salterns, have been characterized by using traditional and genomic techniques, whose results confirmed their condition of new genus within the class *Halobacteriales*, comprised by two different species, for which the names *Halosegnis* gen. nov., *Halosegnis longus* sp. nov. and *Halosegnis rubeus* sp. nov., respectively, have been proposed.

V. The 16S rRNA gene sequence abundance from a total of 18 hypersaline habitats underlined the abundance of the genus *Halosegnis*, specially at intermediate salinities. Besides, members of this genus are worldwide distributed, identified in America, Asia and Europe. Additionally, genomic recruitments showed the prevalence of the species *Halosegnis rubeus* versus *Halosegnis longus* in the studied hypersaline systems.

VI. The results from the comparative genomic study of species of the new genus *Halosegnis* indicated a heterotrophic lifestyle, corroborated by the presence of several related transporters and by the main carbon and nitrogen metabolic pathways. The complete pathway for the biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) has also been identified, suggesting their potential for biotechnological applications. On the other hand, the species of the genus *Halosegnis* possess an acidic proteome with low isoelectric points, supporting a typical *salt-in* osmoregulatory strategy. In addition, the identification of haloarchaeal proton-pumps rhodopsin-like sequences in the genomes of the species of the genus *Halosegnis*, reveals the capacity of these microorganisms to utilize the light.

VII. From different water samples of Isla Cristina saltern and from hypersaline soil samples from the Odiel Saltmarshes we managed to isolate in pure culture three strains related to the genus *Halonotius*, designated F13-13^T, F15B^T and F9-27^T. The phylogenetic and phylogenomic analyses, the polar lipids profile comparison, the complete phenotypic characterization, as well as the determination of the AAI, ANI and DDH parameters of these strains, have permitted their description as three new species of the genus *Halonotius*, and the emended description of this genus. The proposed names for the three new species are *Halonotius aquaticus* sp. nov., *Halonotius terrestris* sp. nov. and *Halonotius roseus* sp. nov., respectively.

VIII. The ecological study of the species of the genus *Halonotius* has revealed that members of this genus are widely distributed in a variety of hypersaline environments from Canada, United States, Bolivia, Tunisia, Spain, Romania, Turkey, Russia, China or Australia. Moreover, along the studied metagenomes, representatives of the genus *Halonotius* constitute a relative proportion of the population on these environments, comprising up to 9 % of the prokaryotic community in aquatic saline environments and up to 1.8 % of the prokaryotic community in saline soils, specially abundant at high salinities (between 19 and 37 % total salts).

IX. The study of the proteome of the species of the genus *Halonotius* highlighted a typical *salt-in* osmoadaptation strategy, characterized by low isoelectric points (around 4.0) and by the presence of secondary transporters for K^+ and Cl^- uptake and for Na^+ extrusion. On the other side, haloarchaeal proton-pumps were found in all *Halonotius* genomes, indicating that ATP synthesis light-mediated is a typical feature of species of this genus. Additionally, the species *Halonotius aquaticus* and *Halonotius terrestris*, also encoded sensory rhodopsins, suggesting additional metabolic flexibility in illuminated conditions for these two species.

X. The detailed study of the metabolism of the species of the genus *Halonotius* have brought to light the presence of the complete cobalamin (vitamin B_{12}) biosynthesis pathway, pointing out the genetic capability of this genus for its *de novo* synthesis, fact that has a substantial relevance in hypersaline environments. Based on the widespread distribution of the genus *Halonotius* and its abundance in hypersaline habitats, we postulate that its members perform a critical role in the microbial community, where they contribute to the maintenance of the environmental cobalamin supply and modulate trophic interactions.

BIBLIOGRAFÍA



A

- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R. & Gálvez, A.** (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *Int J Food Microbiol* **144**: 487–496.
- Abrol, I.P., Yadav, J.S.P. & Massoud, F.I.** (1988). *Salt-affected soils and their management*. FAO soils bulletin 39. Rome.
- Acinas, S.G., Marcelino, L.A., Klepac-Ceraj, V. & Polz, M.F.** (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* **186**: 2629–2635.
- Aitken, D.M. & Brown, A.D.** (1969). Citrate and glyoxylate cycles in the halophil, *Halobacterium salinarium*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **177**: 351–354.
- Al-Mailem, D., Eliyas, M., Khanafer, M. & Radwan, S.** (2014). Culture-dependent and culture-independent analysis of hydrocarbonoclastic microorganisms indigenous to hypersaline environments in Kuwait. *Microb Ecol* **67**: 857–865.
- Altekar, W. & Rangaswamy, V.** (1992). Degradation of endogenous fructose during catabolism of sucrose and mannitol in halophilic archaeobacteria. *Arch Microbiol* **158**: 356–363.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Amoozegar, M.A., Makhdoumi-Kakhki, A., Mehrshad, M., Fazeli, S.A.S., Sproer, C. & Ventosa, A.** (2014). *Halorientalis persicus* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake and emended description of the genus *Halorientalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 940–944.
- Amoozegar, M.A., Safarpour, A., Noghabi, K.A., Bakhtiary, T. & Ventosa, A.** (2019). Halophiles and their vast potential in biofuel production. *Front Microbiol* **10**: 1895.
- Amoozegar, M.A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H. & Ventosa, A.** (2017). Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology* **163**: 623–645.
- Amtul, Z. & Aziz, A.A.** (2017). Microbial proteins as novel industrial biotechnology hosts to treat epilepsy. *Mol Neurobiol* **54**: 8211–8224.
- Anderson, I., Scheuner, C., Göker, M., Mavromatis, K., Hooper, S.D., Porat, I., Klenk, H.-P., Ivanova, N. & Kyrpides, N.** (2011). Novel insights into the diversity of catabolic metabolism from ten haloarchaeal genomes. *PLoS One* **6**: e20237.
- Andrei, A.-Ş., Banciu, H.L. & Oren, A.** (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol Lett* **330**: 1–9.

- Andrews, S.** (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Angelini, R., Corral, P., Lopalco, P., Ventosa, A. & Corcelli, A.** (2012). Novel ether lipid cardiolipins in archaeal membranes of extreme haloalkaliphiles. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1818**: 1365–1373.
- Antón, J., Amann, R. & Rosselló-Mora, R.** (2017). *Salinibacter*. In: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., DeVos, P., Hedlund, B. and Dedysh, S. (eds), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, West Sussex.
- Antón, J., Llobet-Brossa, E., Rodríguez-Valera, F. & Amann, R.** (1999). Fluorescence *in situ* hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environ Microbiol* **1**: 517–23.
- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. & Rosselló-Mora, R.** (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the *Bacteria* from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 485–491.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F. & Amann, R.** (2000). Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3052–3057.
- Antony, C.P., Kumaresan, D., Hunger, S., Drake, H.L., Murrell, J.C. & Shouche, Y.S.** (2013). Microbiology of Lonar Lake and other soda lakes. *ISME J* **7**: 468–476.
- Arahal, D.R.** (1997). La microbiota del Mar Muerto: 50 años después. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Arahal, D.R., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Volcani, B.E. & Ventosa, A.** (1996). Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3779–3786.
- Arahal, D.R., Oren, A. & Ventosa, A.** (2017). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Halobacteria* and subcommittee on the taxonomy of *Halomonadaceae*. Minutes of the joint open meeting, 11 July 2017, Valencia, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 4279–4283.
- Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., Tallon, R., Quesada, E. & Béjar, V.** (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* **7**: 319–326.
- Arndt, D., Grant, J.R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y. & Wishart, D.S.** (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res* **44**: W16–W21.

- Ashwini, R., Vijayanand, S. & Hemapriya, J.** (2017). Photonic potential of haloarchaeal pigment bacteriorhodopsin for future electronics: A review. *Curr Microbiol* **74**: 996–1002.
- Atanasova, N.S., Demina, T.A., Krishnam Rajan Shanthi, S.N.V., Oksanen, H.M. & Bamford, D.H.** (2018). Extremely halophilic pleomorphic archaeal virus HRPVg extends the diversity of pleolipoviruses with integrases. *Res Microbiol* **169**: 500–504.
- Atanasova, N.S., Oksanen, H.M. & Bamford, D.H.** (2015). Haloviruses of archaea, bacteria, and eukaryotes. *Curr Opin Microbiol* **25**: 40–48.
- Atanasova, N.S., Roine, E., Oren, A., Bamford, D.H. & Oksanen, H.M.** (2012). Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environ Microbiol* **14**: 426–440.
- Auch, A.F., von Jan, M., Klenk, H.-P. & Göker, M.** (2010a). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci* **2**: 117–134.
- Auch, A.F., Klenk, H.-P. & Göker, M.** (2010b). Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Stand Genomic Sci* **2**: 142–148.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko, O.** (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**: 75.

B

- Baati, H., Guermazi, S., Amdouni, R., Gharsallah, N., Sghir, A. & Ammar, E.** (2008). Prokaryotic diversity of a Tunisian multipond solar saltern. *Extremophiles* **12**: 505–518.
- Baati, H., Jarboui, R., Gharsallah, N., Sghir, A. & Ammar, E.** (2011). Molecular community analysis of magnesium-rich bittern brine recovered from a Tunisian solar saltern. *Can J Microbiol* **57**: 975–981.
- Bajpai, B., Chaudhary, M. & Saxena, J.** (2015). Production and characterization of α -amylase from an extremely halophilic archaeon, *Haloferax* sp. HA10. *Food Technol Biotechnol* **53**: 11–17.
- Ballav, S., Kerkar, S., Thomas, S. & Augustine, N.** (2015). Halophilic and halotolerant actinomycetes from a marine saltern of Goa, India producing anti-bacterial metabolites. *J Biosci Bioeng* **119**: 323–330.
- Banciu, H.L., Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Galinski, E.A., Muntyan, M.S., Kuenen, J.G. &**

- Muyzer, G.** (2008). Influence of salts and pH on growth and activity of a novel facultatively alkaliphilic, extremely salt-tolerant, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing gammaproteobacterium *Thioalkalibacter halophilus* gen. nov., sp. nov. from South-Western Siberian soda lakes. *Extremophiles* **12**: 391–404.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prijbelski, A.D., Pyshkin, A. V, Sirotkin, A. V, Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A. & Pevzner, P.A.** (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* **19**: 455–477.
- Barghini, P., Pasqualetti, M., Gorrasi, S. & Fenice, M.** (2018). Bacteria from the “Saline di Tarquinia” marine salterns reveal very atypical growth profiles with regards to salinity and temperature. *Mediterr Mar Sci* **19**: 513–525.
- Baricz, A., Coman, C., Andrei, A.S., Muntean, V., Keresztes, Z.G., Păușan, M., Alexe, M. & Banciu, H.L.** (2014). Spatial and temporal distribution of archaeal diversity in meromictic, hypersaline Ocnei Lake (Transylvanian Basin, Romania). *Extremophiles* **18**: 399–413.
- Barnard, D., Casanueva, A., Tuffin, M. & Cowan, D.** (2010). Extremophiles in biofuel synthesis. *Environ Technol* **31**: 871–888.
- Barritt, M.M.** (1936). The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. *J Pathol Bacteriol* **42**: 441–454.
- Becker, E.A., Seitzer, P.M., Tritt, A., Larsen, D., Krusor, M., Yao, A.I., Wu, D., Madern, D., Eisen, J. a, Darling, A.E. & Facciotti, M.T.** (2014). Phylogenetically driven sequencing of extremely halophilic archaea reveals strategies for static and dynamic osmo-response. *PLoS Genet* **10**: e1004784.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. & Hoondal, G.S.** (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 326–338.
- Béjar, V., Llamas, I., Calvo, C. & Quesada, E.** (1998). Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. *J Biotechnol* **61**: 135–141.
- Benlloch, S., Acinas, S.G., Antón, J., López-López, A., Luz, S.P. & Rodríguez-Valera, F.** (2001). Archaeal biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. *Microb Ecol* **41**: 12–19.
- Benlloch, S., Acinas, S.G., Martinez-Murcia, A.J. & Rodríguez-Valera, F.** (1996). Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. *Hydrobiologia* **329**: 19–31.
- Benlloch, S., López-López, A., Casamayor, E.O., Øvreås, L., Goddard, V., Daae, F.L., Smerdon, G., Massana, R., Joint, I., Thingstad, F., Pedrós-Alió, C. & Rodríguez-Valera, F.** (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal

- solar saltern. *Environ Microbiol* **4**: 349–360.
- Benlloch, S., Martínez-Murcia, A.J. & Rodríguez-Valera, F.** (1995). Sequencing of bacterial and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment. *Syst Appl Microbiol* **18**: 574–581.
- Bertrand, E.M., Saito, M.A., Jeon, Y.J. & Neilan, B.A.** (2011). Vitamin B₁₂ biosynthesis gene diversity in the Ross Sea: the identification of a new group of putative polar B₁₂ biosynthesizers. *Environ Microbiol* **13**: 1285–1298.
- Bertrand, J.C., Almallah, M., Acquaviva, M. & Mille, G.** (1990). Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium. *Lett Appl Microbiol* **11**: 260–263.
- Bickel-Sandkötter, S., Gärtner, W. & Dane, M.** (1996). Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis. *Arch Microbiol* **166**: 1–11.
- Bivin, D.B. & Stoeckenius, W.** (1986). Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. *Microbiology* **132**: 2167–2177.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911–917.
- Blom, J., Albaum, S.P., Doppmeier, D., Pühler, A., Vorhölter, F.-J., Zakrzewski, M. & Goesmann, A.** (2009). EDGAR: A software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics* **10**: 154.
- Bodaker, I., Sharon, I., Suzuki, M.T., Feingersch, R., Shmoish, M., Andreishcheva, E., Sogin, M.L., Rosenberg, M., Maguire, M.E., Belkin, S., Oren, A. & Béjà, O.** (2010). Comparative community genomics in the Dead Sea: an increasingly extreme environment. *ISME J* **4**: 399–407.
- Bodaker, I., Suzuki, M.T., Oren, A. & Béjà, O.** (2012). Dead Sea rhodopsins revisited. *Environ Microbiol Rep* **4**: 617–621.
- Bogomolni, R.A. & Spudich, J.L.** (1982). Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6250–6254.
- Bolhuis, A.** (2002). Protein transport in the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1: a major role for the twin-arginine translocation pathway? *Microbiology* **148**: 3335–3346.
- Bolhuis, H., Palm, P., Wende, A., Falb, M., Rampp, M., Rodríguez-Valera, F., Pfeiffer, F. & Oesterhelt, D.** (2006). The genome of the square archaeon *Haloquadratum walsbyi*: life at the limits of water activity. *BMC Genomics* **7**: 169.
- Bolhuis, H., Poele, E.M. & Rodríguez-valera, F.** (2004). Isolation and cultivation of Walsby's square archaeon. *Environ Microbiol* **6**: 1287–1291.
- Bomar, L., Maltz, M., Colston, S. & Graf, J.** (2011). Directed culturing of microorganisms

using metatranscriptomics. *MBio* 2: e00012-11.

Bonete, M., Martínez-Espinosa, R., Pire, C., Zafrilla, B. & Richardson, D.J. (2008). Nitrogen metabolism in haloarchaea. *Saline Systems* 4: 9.

Borowitzka, L.J., Kessly, D.S. & Brown, A.D. (1977). The salt relations of *Dunaliella*. *Arch Microbiol* 113: 131–138.

Bott, R., Jensen, R., Kelemen, B., Donald, E. & Whited, G. (2013). Composition comprising various proteorhodopsins and/or bacteriorhodopsins and use thereof. U.S. Patent No. 8,372,953. 12.

Boucher, Y., Douady, C.J., Sharma, A.K., Kamekura, M. & Doolittle, W.F. (2004). Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among haloarchaeal rRNA genes. *J Bacteriol* 186: 3980–3990.

Boujelben, I., Gomariz, M., Martínez-García, M., Santos, F., Peña, A., López, C., Antón, J. & Maalej, S. (2012a). Spatial and seasonal prokaryotic community dynamics in ponds of increasing salinity of Sfax solar saltern in Tunisia. *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 845–857.

Boujelben, I., Yarza, P., Almansa, C., Villamor, J., Maalej, S., Antón, J. & Santos, F. (2012b). Virioplankton community structure in Tunisian solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 78: 7429–7437.

Bowers, K.J., Mesbah, N.M. & Wiegel, J. (2009). Biodiversity of poly-extremophilic bacteria: does combining the extremes of high salt, alkaline pH and elevated temperature approach a physico-chemical boundary for life? *Saline Systems* 5: 9.

Bowman, J.P., McCammon, S.A., Rea, S.M. & McMeekin, T.A. (2000). The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FEMS Microbiol Lett* 183: 81–88.

Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B. & Siebers, B. (2014). Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 89–175.

Breitbart, M. & Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 13: 278–284.

Brettin, T., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Olsen, G.J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G.D., Shukla, M., Thomason Iii, J.A., Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A.R. & Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep* 5: 8365.

Brock, T.D. (1979). Ecology of saline lakes. In: Shilo, M. (ed), *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*. Verlag Chem, Weinheim, pp. 29–47.

- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J.** (2003). *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Upper Saddle River (NJ).
- Buenger, J. & Driller, H.** (2004). Ectoin: An effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* **17**: 232–237.
- Burns, D.G., Camakaris, H.M., Janssen, P.H. & Dyll-Smith, M.L.** (2004). Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most haloarchaeal groups in an Australian crystallizer pond are cultivable. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5258–5265.
- Burns, D.G., Janssen, P.H., Itoh, T., Kamekura, M., Li, Z., Jensen, G., Rodríguez-Valera, F., Bolhuis, H. & Dyll-Smith, M.L.** (2007). *Haloquadratum walsbyi* gen. nov., sp. nov., the square haloarchaeon of Walsby, isolated from saltern crystallizers in Australia and Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 387–392.
- Burns, D.G., Janssen, P.H., Itoh, T., Minegishi, H., Usami, R., Kamekura, M. & Dyll-Smith, M.L.** (2010a). *Natronomonas moolapensis* sp. nov., non-alkaliphilic isolates recovered from a solar saltern crystallizer pond, and emended description of the genus *Natronomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 1173–1176.
- Burns, D.G., Janssen, P.H., Itoh, T., Kamekura, M., Echigo, A. & Dyll-Smith, M.L.** (2010b). *Halonotius pteroides* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon recovered from a saltern crystallizer. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 1196–1199.
- Bushnell, B.** (2016). BBMap project. Available online at: sourceforge.net/projects/bbmap/
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A. & Gunde-Cimerman, N.** (2005a). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* **244**: 229–234.
- Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitaš, A. & Gunde-Cimerman, N.** (2005b). Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Bot Mar* **48**: 73–79.
- Butinar, L., Zalar, P., Frisvad, J.C. & Gunde-Cimerman, N.** (2005c). The genus *Eurotium* — Members of indigenous fungal community in hypersaline waters of salterns. *FEMS Microbiol Ecol* **51**: 155–166.
- Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z. & Sultan, M.T.** (2008). Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technol Biotechnol* **46**: 22–31.

C

- Cai, L., Zhao, D., Hou, J., Wu, J., Cai, S., Dassarma, P. & Xiang, H.** (2012). Cellular and organellar membrane-associated proteins in haloarchaea: perspectives on the physiological significance and biotechnological applications. *Sci China Life Sci* **55**: 404–414.

- Canfora, L., Bacci, G., Pinzari, F., Lo Papa, G., Dazzi, C. & Benedetti, A. (2014). Salinity and bacterial diversity: to what extent does the concentration of salt affect the bacterial community in a saline soil? *PLoS One* **9**: e106662.
- Canfora, L., Lo Papa, G., Vittori Antisari, L., Bazan, G., Dazzi, C. & Benedetti, A. (2015). Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area. *Appl Soil Ecol* **93**: 120–129.
- Cao, J., Barbosa, J.M., Singh, N.K. & Locy, R.D. (2013) GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production. *Yeast* **30**: 129–144.
- Cao, Y., Liao, L., Xu, X., Oren, A., Wang, C., Zhu, X. & Wu, M. (2008a). Characterization of alcohol dehydrogenase from the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis*. *Extremophiles* **12**: 471–476.
- Cao, Y., Liao, L., Xu, X., Oren, A. & Wu, M. (2008b). Aldehyde dehydrogenase of the haloalkaliphilic archaeon *Natronomonas pharaonis* and its function in ethanol metabolism. *Extremophiles* **12**: 849–854.
- Capella-Gutierrez, S., Silla-Martinez, J.M. & Gabaldon, T. (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* **25**: 1972–1973.
- Carden, D.E., Walker, D.J., Flowers, T.J. & Miller, A.J. (2003). Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiol* **131**: 676–683.
- Carson, J.K., Gonzalez-Quñones, V., Murphy, D. V., Hinz, C., Shaw, J.A. & Gleeson, D.B. (2010). Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3936–3942.
- Casamayor, E.O., Calderón-Paz, J.I. & Pedrós-Alió, C. (2000). 5S rRNA fingerprints of marine bacteria, halophilic archaea and natural prokaryotic assemblages along a salinity gradient. *FEMS Microbiol Ecol* **34**: 113–119.
- Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V.J., Gasol, J.M., Joint, I., Rodríguez-Valera, F. & Pedrós-Alió, C. (2002). Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* **4**: 338–348.
- Casanueva, A., Galada, N., Baker, G.C., Grant, W.D., Heaphy, S., Jones, B., Yanhe, M., Ventosa, A., Blamey, J. & Cowan, D.A. (2008). Nanoarchaeal 16S rRNA gene sequences are widely dispersed in hyperthermophilic and mesophilic halophilic environments. *Extremophiles* **12**: 651–656.
- Castellanos, E.M., Figueroa, M.E. & Davy, A.J. (1994). Nucleation and facilitation in saltmarsh succession: interactions between *Spartina maritima* and *Arthrocnemum perenne*. *J Ecol* **82**: 239–248.

- Caton, T.M., Caton, I.R., Witte, L.R. & Schneegurt, M.A.** (2009). Archaeal diversity at the Great Salt Plains of Oklahoma described by cultivation and molecular analyses. *Microb Ecol* **58**: 519–528.
- Caton, T.M., Witte, L.R., Ngyuen, H.D., Buchheim, J.A., Buchheim, M.A. & Schneegurt, M.A.** (2004). Halotolerant aerobic heterotrophic bacteria from the Great Salt Plains of Oklahoma. *Microb Ecol* **48**: 449–462.
- Cayol, J., Ollivier, B., Patel, B.K.C., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Prensier, G. & García, J.** (1995). Fermentative bacterium from the sediments of a hypersaline lake. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 790–797.
- Charlesworth, J.C. & Burns, B.P.** (2015). Untapped resources: Biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in *Archaea*. *Archaea* **2015**: 1–7.
- Chen, X.-R., Huang, Y.-C., Yi, H.-P. & Yang, C.-S.** (2016). A unique light-driven proton transportation signal in halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*. *Biophys J* **111**: 2600–2607.
- Cho, B.C.** (2005). Heterotrophic flagellates in hypersaline waters. In: Gunde-Cimerman, N., Oren, A. and Plemenitaš, A. (eds), *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 541–549.
- Christensen, W.B.** (1946). Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol* **52**: 461–466.
- Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D.R., da Costa, M.S., Rooney, A.P., Yi, H., Xu, X.-W., De Meyer, S. & Trujillo, M.E.** (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 461–466.
- Çinar, S. & Mutlu, M.B.** (2016). Comparative analysis of prokaryotic diversity in solar salterns in eastern Anatolia (Turkey). *Extremophiles* **20**: 589–601.
- Clarke, P.H.** (1953). Hydrogen sulphide production by bacteria. *J Gen Microbiol* **8**: 397–407.
- Clarkson, D.T. & Hanson, J.B.** (1980). The mineral nutrition of higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 239–298.
- Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J. & Moye-Rowley, W.S.** (2001). Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **276**: 244–250.
- Compeau, P.E.C., Pevzner, P.A. & Tesler, G.** (2011). How to apply de Bruijn graphs to genome assembly. *Nat Biotechnol* **29**: 987–991.
- Corral, P.** (2013). Caracterización de arqueas halófilas basada en el estudio de la composición de lípidos polares y otros métodos taxonómicos. Tesis Doctoral.

Universidad de Sevilla.

- da Costa, M.S., Santos, H. & Galinski, E.A.** (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in *Bacteria* and *Archaea*. In: Antranikian G. (eds), *Biotechnology of Extremophiles. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 117–153.
- Couto-Rodríguez, R.L. & Montalvo-Rodríguez, R.** (2019). Temporal analysis of the microbial community from the crystallizer ponds in Cabo Rojo, Puerto Rico, using metagenomics. *Genes* **10**: 422.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E.P.C., Vergnaud, G., Gautheret, D. & Pourcel, C.** (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res* **46**: W246–W251.
- Cowan, S.T. & Steel, K.J.** (1982). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica, 2ª ed. Compañía Editorial Continental, México D.F..
- Cray, J.A., Russell, J.T., Timson, D.J., Singhal, R.S. & Hallsworth, J.E.** (2013). A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity. *Environ Microbiol* **15**: 287–296.
- Criscuolo, A. & Gribaldo, S.** (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol Biol* **10**: 210.
- Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P., Zanetti, G. & Fotia, G.** (2014). Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics* **30**: 1928–1929.
- Cui, H.L., Yang, X., Gao, X. & Xu, X.W.** (2011). *Halobellus clavatus* gen. nov., sp. nov. and *Halorientalis regularis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2682–2689.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T. & Scannell, J.W.** (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10494–10499.
- Czech, L. & Bremer, E.** (2018). With a pinch of extra salt—Did predatory protists steal genes from their food? *PLoS Biol* **16**: e2005163.
- Czech, L., Hermann, L., Stöveken, N., Richter, A.A., Höppner, A., Smits, S.H.J., Heider, J. & Bremer, E.** (2018). Role of the extremolytes ectoine and hydroxyectoine as stress protectants and nutrients: genetics, phylogenomics, biochemistry, and structural analysis. *Genes* **9**: E177.

D

- Dalvi, S., Youssef, N.H. & Fathepure, B.Z.** (2016). Microbial community structure analysis of a benzoate-degrading halophilic archaeal enrichment. *Extremophiles* **20**: 311–321.
- Danielson, D.L., Akindele, O.A., Askins, M., Bergevin, M., Bernstein, A., Burns, J., Carroll, A., Coleman, J., Collins, R., Connor, C., Cowen, D.F., Dalnoki-Veress, F., Dazeley, S., Diwan, M. V., Duron, J., Dye, S.T., Eisch, J., Ezeribe, A., Fischer, V., Foster, R., Frankiewicz, K., Grant, C., Gribble, J., He, J., Holligan, C., Holt, G., Huang, W., Jovanovic, I., Kneale, L., Korkeila, L., Kudryavtsev, V.A., Kunkle, P., Mak, R.L.K., Learned, J.G., Lewis, P., Li, V.A., Liu, X., Malek, M., Maricic, J., Mauger, C., McCauley, N., Metelko, C., Mills, R., Muheim, F., Murphy, A.S.J., Needham, M., Nishimura, K., Gann, G.D.O., Paling, S.M., Pershing, T., Pickard, L., Pinheiro, B., Quillin, S., Rogers, S., Scarff, A., Schnellbach, Y., Scovell, P.R., Shaw, T., Shebalin, V., Smith, G.D., Smy, M.B., Spooner, N., Sutanto, F., Svoboda, R., Thompson, L.F., Toth, C., Vagins, M.R., Ventura, S., Wetstein, M.J. & Yeh, M.** (2019). Directionally accelerated detection of an unknown second reactor with antineutrinos for mid-field nonproliferation monitoring. *arXiv:1909.05374*
- Danson, M.J.** (1993). Central metabolism of the archaea. *New Compr Biochem* **26**: 1–24.
- DasSarma, S. & DasSarma, P.** (2015). Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Curr Opin Microbiol* **25**: 120–126.
- dC Rubin, S.S., Marín, I., Gómez, M.J., Morales, E.A., Zekker, I., San Martín-Uriz, P., Rodríguez, N. & Amils, R.** (2017). Prokaryotic diversity and community composition in the Salar de Uyuni, a large scale, chaotropic salt flat. *Environ Microbiol* **19**: 3745–3754.
- DeMaere, M.Z., Williams, T.J., Allen, M.A., Brown, M. V., Gibson, J.A.E., Rich, J., Lauro, F.M., Dyal-Smith, M., Davenport, K.W., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Tringe, S.G. & Cavicchioli, R.** (2013). High level of intergenera gene exchange shapes the evolution of haloarchaea in an isolated Antarctic lake. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 16939–16944.
- Demina, T., Pietilä, M., Svirskaitė, J., Ravantti, J., Atanasova, N., Bamford, D. & Oksanen, H.** (2017). HCIV-1 and other tailless icosahedral internal membrane-containing viruses of the family Sphaerolipoviridae. *Viruses* **9**: 32.
- Demina, T.A., Atanasova, N.S., Pietilä, M.K., Oksanen, H.M. & Bamford, D.H.** (2016). Vesicle-like virion of *Haloarcula hispanica* pleomorphic virus 3 preserves high infectivity in saturated salt. *Virology* **499**: 40–51.
- Deole, R., Challacombe, J., Raiford, D.W. & Hoff, W.D.** (2013). An extremely halophilic proteobacterium combines a highly acidic proteome with a low cytoplasmic potassium content. *J Biol Chem* **288**: 581–588.
- Desjardins, P.R. & Conklin, D.S.** (2011). Microvolume quantitation of nucleic acids. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, pp.

A.3J.1-A.3J.16

- Dickson, J.L., Head, J.W., Levy, J.S. & Marchant, D.R.** (2013). Don Juan Pond, Antarctica: Near-surface CaCl_2 -brine feeding Earth's most saline lake and implications for Mars. *Sci Rep* **3**: 1166.
- Díez, B., Antón, J., Guixa-Boixereu, N., Pedrós-Alió, C. & Rodríguez-Valera, F.** (2000). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of virus assemblages present in a hypersaline environment. *Int Microbiol* **3**: 159–164.
- Dillon, J.G., Carlin, M., Gutierrez, A., Nguyen, V. & McLain, N.** (2013). Patterns of microbial diversity along a salinity gradient in the Guerrero Negro solar saltern, Baja CA Sur, Mexico. *Front Microbiol* **4**: 399.
- Ding, J. & Lai, M.** (2010). The biotechnological potential of the extreme halophilic archaea *Haloterrigena* sp. H13 in xenobiotic metabolism using a comparative genomics approach. *Environ Technol* **31**: 905–914.
- Doxey, A.C., Kurtz, D.A., Lynch, M.D., Sauder, L.A. & Neufeld, J.D.** (2015). Aquatic metagenomes implicate *Thaumarchaeota* in global cobalamin production. *ISME J* **9**: 461–471.
- Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A.** (2019a). *Halorientalis pallida* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a marine saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**: 3636–3643.
- Durán-Viseras, A., Andrei, A.S., Ghai, R., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A.** (2019b). New *Halonotius* species provide genomics-based insights into cobalamin synthesis in haloarchaea. *Front Microbiol* **10**: 1928.
- Durán-Viseras, A., Ventosa, A. & Sánchez-Porro, C.** (2019c). *Halonotius aquaticus* sp. nov., a new haloarchaeon isolated from a marine saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**: 1306–1312.
- Duschl, A., Lanyi, J.K. & Zimányi, L.** (1990). Properties and photochemistry of a halorhodopsin from the haloalkalophile, *Natronobacterium pharaonis*. *J Biol Chem* **265**: 1261–1267.
- Duschl, A. & Wagner, G.** (1986). Primary and secondary chloride transport in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **168**: 548–552.
- Dyall-Smith, M., Palm, P., Wanner, G., Witte, A., Oesterhelt, D. & Pfeiffer, F.** (2019). *Halobacterium salinarum* virus ChaoS9, a novel halovirus related to PhiH1 and PhiCh1. *Genes* **10**: 194.

E

- Echigo, A., Minegishi, H., Shimane, Y., Kamekura, M., Itoh, T. & Usami, R.** (2013). *Halomicroarcula pellucida* gen. nov., sp. nov., a non-pigmented, transparent-colony-forming, halophilic archaeon isolated from solar salt. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 3556–3562.
- Eddy, S.R.** (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comput Biol* **7**: e1002195–e1002195.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**: 113.
- Edgar, R.C.** (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460–2461.
- Edgerton, M.E. & Brimblecombe, P.** (1981). Thermodynamics of halobacterial environments. *Can J Microbiol* **27**: 899–909.
- Edwards, D.J. & Holt, K.E.** (2013). Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microb Inform Exp* **3**: 2.
- Eichler, J.** (2001). Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnol Adv* **19**: 261–278.
- Eisenman, G.** (1961). On the elementary atomic origin of equilibrium ionic specificity. In: *Symposium on membrane transport and metabolism*. Academic Press, New York, pp. 163–179.
- Eklom, R. & Wolf, J.B.W.** (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evol Appl* **7**: 1026–1042.
- Elcock, A.H. & McCammon, J.A.** (1998). Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins. *J Mol Biol* **280**: 731–748.
- Elevi-Bardavid, R. & Oren, A.** (2012a). Acid-shifted isoelectric point profiles of the proteins in a hypersaline microbial mat: an adaptation to life at high salt concentrations? *Extremophiles* **16**: 787–792.
- Elevi-Bardavid, R. & Oren, A.** (2012b). The amino acid composition of proteins from anaerobic halophilic bacteria of the order *Halanaerobiales*. *Extremophiles* **16**: 567–572.
- Elms, J., Fishwick, D., Walker, J., Rawbone, R., Jeffrey, P., Griffin, P., Gibson, M. & Curran, A.D.** (2003). Prevalence of sensitisation to cellulase and xylanase in bakery workers. *Occup Environ Med* **60**: 802–804.
- Emerson, D., Chauhan, S., Oriel, P. & Breznak, J.A.** (1994). *Haloferax* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Arch Microbiol* **161**: 445–452.

- Emerson, J.B., Norman, A., Allen, E.E., Tyrrell, H.L., Emerson, J.B., Andrade, K., Thomas, B.C., Norman, A., Allen, E.E., Heidelberg, K.B. & Banfield, J.F. (2013). Virus-host and CRISPR dynamics in *Archaea*-dominated hypersaline Lake Tyrrell, Victoria, Australia. *Archaea* **2013**: 370871.
- Empadinhas, N. & Da Costa, M.S. (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int Microbiol* **11**: 151-161
- Enache, M., Itoh, T., Fukushima, T., Usami, R., Dumitru, L. & Kamekura, M. (2007). Phylogenetic relationships within the family *Halobacteriaceae* inferred from *rpoB*' gene and protein sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2289–2295.
- Engelhard, C., Chizhov, I., Siebert, F. & Engelhard, M. (2018). Microbial halorhodopsins: light-driven chloride pumps. *Chem Rev* **118**: 10629–10645.
- Epstein, W. (2003). The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **75**: 293–320.
- Ernst, O.P., Lodowski, D.T., Elstner, M., Hegemann, P. & Brown, L.S. (2014). Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev* **114**: 126–163.
- Estrada, M., Henriksen, P., Gasol, J.M., Casamayor, E.O. & Pedrós-Alió, C. (2004). Diversity of planktonic photoautotrophic microorganisms along a salinity gradient as depicted by microscopy, flow cytometry, pigment analysis and DNA-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 281–293.

F

- Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronau, S., Gonzalez, O., Pfeiffer, F., Bornberg-Bauer, E. & Oesterhelt, D. (2008). Metabolism of halophilic *Archaea*. *Extremophiles* **12**: 177–196.
- Falb, M., Pfeiffer, F., Palm, P., Rodewald, K., Hickmann, V., Tittor, J. & Oesterhelt, D. (2005). Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Res* **15**: 1336–1343.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution (N Y)* **39**: 783–791.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368–376.
- Fernández-Castillo, R., Rodríguez-Valera, F., Gonzalez-Ramos, J. & Ruiz-Berraquero, F. (1986). Accumulation of poly (β -hydroxybutyrate) by halobacteria. *Appl Environ Microbiol* **51**: 214–216.

- Fernández, A.B., Ghai, R., Martín-Cuadrado, A.-B., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F. & Ventosa, A. (2014a). Prokaryotic taxonomic and metabolic diversity of an intermediate salinity hypersaline habitat assessed by metagenomics. *FEMS Microbiol Ecol* **88**: 623–635.
- Fernández, A.B., Vera-gargallo, B., Sánchez-porro, C., Ghai, R., Papke, R.T., Rodríguez-Valera, F. & Ventosa, A. (2014b). Comparison of prokaryotic community structure from Mediterranean and Atlantic saltern concentrator ponds by a metagenomic approach. *Front Microbiol* **5**: 1–12.
- Ferrer, M., Sorokin, D.Y., Wolf, Y.I., Ciordia, S., Mena, M.C., Bargiela, R., Koonin, E. V. & Makarova, K.S. (2018). Proteomic analysis of *Methanonatronarchaeum thermophilum* AMET1, a representative of a putative new class of Euryarchaeota, “Methanonatronarchaeia”. *Genes* **9**: 28.
- Finn, R.D., Clements, J., Arndt, W., Miller, B.L., Wheeler, T.J., Schreiber, F., Bateman, A. & Eddy, S.R. (2015). HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Res* **43**: W30–W38.
- Finstad, K.M., Probst, A.J., Thomas, B.C., Andersen, G.L., Demergasso, C., Echeverría, A., Amundson, R.G. & Banfield, J.F. (2017). Microbial community structure and the persistence of cyanobacterial populations in salt crusts of the hyperarid Atacama desert from genome-resolved metagenomics. *Front Microbiol* **8**: 1435.
- Forsyth, M.P. & Kushner, D.J. (1970). Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Can J Microbiol* **13**: 142–147.
- Fothergill-Gilmore, L.A. & Michels, P.A.M. (1993). Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol* **59**: 105–235.
- Fox-Powell, M.G., Hallsworth, J.E., Cousins, C.R. & Cockell, C.S. (2016). Ionic strength is a barrier to the habitability of Mars. *Astrobiology* **16**: 427–442.
- Frazier, W.C. (1926). A method for the detection of changes in gelatin due to Bacteria. *J Infect Dis* **39**: 302–309.
- Freitas, F., Alves, V.D. & Reis, M.A.M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol* **29**: 388–398.
- Frigaard, N.-U., Martinez, A., Mincer, T.J. & DeLong, E.F. (2006). Proteorhodopsin lateral gene transfer between marine planktonic Bacteria and Archaea. *Nature* **439**: 847–850.
- Fu, C.Q., Zhao, Q., Li, Z.Y., Wang, Y.X., Zhang, S.Y., Lai, Y.H., Xiao, W. & Cui, X.L. (2016). A novel *Halomonas ventosae*-specific virulent halovirus isolated from the Qiaohou salt mine in Yunnan, Southwest China. *Extremophiles* **20**: 101–110.
- Fu, X.T. & Kim, S.M. (2010). Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar Drugs* **8**: 200–218.

- Fujisawa, T., Kiyota, H., Kikukawa, T. & Unno, M.** (2019). Low-temperature Raman spectroscopy of halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*: structural discrimination of blue-shifted and red-shifted photoproducts. *Biochemistry* **58**: 4159–4167.
- Furusho, K., Yoshizawa, T. & Shoji, S.** (2005). Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado–Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis* **20**: 170–178.

G

- Gabani, P. & Singh, O. V.** (2013). Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 993–1004.
- Galinski, E.A.** (1993). Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* **49**: 487–496.
- Galinski, E.A.** (1995). Osmoadaptation in *Bacteria*. *Adv Microb Physiol* **37**: 273–328.
- Galinski, E.A. & Trüper, H.G.** (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 95–108.
- Galisteo, C., Sánchez-Porro, C., de la Haba, R.R., López-Hermoso, C., Fernández, A.B., Farias, M.E. & Ventosa, A.** (2019). Characterization of *Salinivibrio socompensis* sp. nov., a new halophilic bacterium isolated from the high-altitude hypersaline Lake Socompa, Argentina. *Microorganisms* **7**: 241.
- Garabito, M.J., Márquez, M. & Ventosa, A.** (1998). Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline environments. *Can J Microbiol* **44**: 95–102.
- García-Heredia, I., Martín-Cuadrado, A.B., Mojica, F.J.M., Santos, F., Mira, A., Antón, J. & Rodríguez-Valera, F.** (2012). Reconstructing viral genomes from the environment using fosmid clones: the case of haloviruses. *PLoS One* **7**: e33802.
- Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A.B., Martín-Cuadrado, A.-B., Mizuno, C.M., McMahon, K.D., Papke, R.T., Stepanauskas, R., Rodríguez-Brito, B., Rohwer, F., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. & Rodríguez-Valera, F.** (2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. *Sci Rep* **1**: 135.
- Glatz, R.E., Lepp, P.W., Ward, B.B. & Francis, C.A.** (2006). Planktonic microbial community composition across steep physical/chemical gradients in permanently ice-covered Lake Bonney, Antarctica. *Geobiology* **4**: 53–67.
- Gluyas, J., Thompson, L., Allen, D., Benton, C., Chadwick, P., Clark, S., Klinger, J., Kudryavtsev, V., Lincoln, D., Maunder, B., Mitchell, C., Nolan, S., Paling, S., Spooner, N., Staykov, L., Telfer, S., Woodward, D. & Coleman, M.** (2019). Passive, continuous

- monitoring of carbon dioxide geostorage using muon tomography. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* **377**: 20180059.
- Gochnauer, M.B., Leppard, G.G., Komaratat, P., Kates, M., Novitsky, T. & Kushner, D.J.** (1975). Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol* **21**: 1500–1511.
- Goebel, B.M. & Stackebrandt, E.** (1994). Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1614–1621.
- Gomariz, M., Martínez-García, M., Santos, F., Constantino, M., Meseguer, I. & Antón, J.** (2015). Retinal-binding proteins mirror prokaryotic dynamics in multipond solar salterns. *Environ Microbiol* **17**: 514–526.
- Gomariz, M., Martínez-García, M., Santos, F., Rodríguez, F., Capella-Gutiérrez, S., Gabaldón, T., Rosselló-Móra, R., Meseguer, I. & Antón, J.** (2015). From community approaches to single-cell genomics: the discovery of ubiquitous hyperhalophilic *Bacteroidetes* generalists. *ISME J* **9**: 16–31.
- Gomes, J. & Steiner, W.** (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol Biotechnol* **42**: 223–225.
- Gómez-Villegas, P., Vígara, J. & León, R.** (2018). Characterization of the microbial population inhabiting a solar saltern pond of the Odiel Marshlands (SW Spain). *Mar Drugs* **16**: 332.
- Goodfellow, M., Manfio, G.P. & Chun, J.** (1997). Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: Claridge, M.F., Dawah, H.A. and Wilson, M.R. (eds), *Species: The units of Biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp. 25–59.
- Gostinčar, C., Turk, M., Zajc, J. & Gunde-Cimerman, N.** (2019). Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining polyextremotolerant generalist. *Environ Microbiol* **21**: 3638–3652.
- Govorunova, E.G., Sineshchekov, O.A., Li, H. & Spudich, J.L.** (2017). Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications. *Annu Rev Biochem* **86**: 845–872.
- Gradinaru, V., Thompson, K.R. & Deisseroth, K.** (2008). eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol* **36**: 129–139.
- Graf, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F. & Driller, H.** (2008). The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin Dermatol* **26**: 326–333.
- Grant, S., Grant, W.D., Jones, B.E., Kato, C. & Li, L.** (1999). Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles* **3**: 139–145.
- Grant, W., Kamekura, M., Mcgenity, T. & Ventosa, A.** (2001a). Family I. *Halobacteriaceae*. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, M.G. (eds), *Bergey's Manual of*

- Systematic Bacteriology V.I. The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. Springer, New York, pp. 299–301.
- Grant, W., Kamekura, M., Mcgenity, T. & Ventosa, A.** (2001b). Order I. *Halobacteriales*. In: Boone, D.R., Castenholz, R.W. and Garrity, G.M. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology V.I. The Archaea and Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer, New York, pp. 294–299.
- Grant, W.D., Gemmell, R.T. & McGenity, T.J.** (1998). Halophiles. In: Horikoshi, K. and Grant, W.D. (eds), *Extremophiles: Microbial Life in Extreme Environments*. Wiley-Liss, New York, pp. 93–132.
- Grant, W.D. & Larsen, H.** (1989). Group III. Extremely halophilic archaeobacteria. Order *Halobacteriales* ord. nov. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. and Holt, J.G. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 2216–2233.
- Grant, W.D., Pagaling, E., Ma, M.C., Cowan, D.A., Ma, Y., Jones, B.E., Gutie, M.C., Ventosa, A. & Heaphy, S.** (2011). The hypersaline lakes of Inner Mongolia: The MGAtch Project. In: Ventosa, A., Oren, A. and Ma, Y. (eds), *Halophiles and Hypersaline Environments*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 65–107.
- Grant, W.D. & Tindall, B.J.** (1986). The alkaline saline environment. In: Codd, G.A. and Herbert, R.A. (eds), *Microorganisms in Extreme Environments*. Academic Press, London, pp. 25–54.
- Grote, M.** (2011). Enlightening the life sciences: the history of halobacterial and microbial rhodopsin research. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 1082–1099.
- Gu, Z., Gu, L., Eils, R., Schlesner, M. & Brors, B.** (2014). Circlize implements and enhances circular visualization in R. *Bioinformatics* **30**: 2811–2812
- Guixa-Boixareu, N., Calderón-Paz, J.I., Haldal, M., Bratbak, G. & Pedrós-Alió, C.** (1996). Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquat Microb Ecol* **11**: 215–227.
- Gunde-Cimerman, N., Oren, A. & Plemenitaš, A.** (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol Rev* **42**: 353–375.
- Gupta, R.S., Naushad, S. & Baker, S.** (2015). Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1050–1069.
- Gupta, R.S., Naushad, S., Fabros, R. & Adeolu, M.** (2016). A phylogenomic reappraisal of

family-level divisions within the class *Halobacteria*: proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam. nov.. *Antonie van Leeuwenhoek* **109**: 565–587.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. (2013). QAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**: 1072–1075.

Gutell, R.R., Weiser, B., Woese, C.R. & Noller, H.F. (1985). Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **32**: 155–216.

Gutleben, J., Chaib De Mares, M., van Elsas, J.D., Smidt, H., Overmann, J. & Sipkema, D. (2018). The multi-omics promise in context: from sequence to microbial isolate. *Crit Rev Microbiol* **44**: 212–229.

Guy, L., Kultima, J.R., Andersson, S.G.E. & Quackenbush, J. (2010). GenoPlotR: comparative gene and genome visualization in R. *Bioinformatics* **26**: 2334–2335.

H

Haferburg, G., Gröning, J.A.D., Schmidt, N., Kummer, N.A., Erquicia, J.C. & Schlömann, M. (2017). Microbial diversity of the hypersaline and lithium-rich Salar de Uyuni, Bolivia. *Microbiol Res* **199**: 19–28.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95–98.

Hamaki, T., Suzuki, M., Fudou, R., Jojima, Y., Kajiura, T., Tabuchi, A., Sen, K. & Shibai, H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng* **99**: 485–492.

Hamm, J.N., Erdmann, S., Eloë-Fadrosch, E.A., Angeloni, A., Zhong, L., Brownlee, C., Williams, T.J., Barton, K., Carswell, S., Smith, M.A., Brazendale, S., Hancock, A.M., Allen, M.A., Raftery, M.J. & Cavicchioli, R. (2019). Unexpected host dependency of Antarctic Nanohaloarchaeota. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 14661.

Han, R., Zhang, X., Liu, J., Long, Q., Chen, L., Liu, D. & Zhu, D. (2017). Microbial community structure and diversity within hypersaline Keke salt lake environments. *Can J Microbiol* **63**: 895–908.

Harrigan, W.F. & McCance, M.E. (1979). Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos, Academia, León.

Harrison, F.C. & Kennedy, M. (1922). The red discoloration of cured codfish. *Proc Trans R Soc Canada* **16**: 101.

- Hartford, T. & Sneath, P.H.A.** (1988). Distortion of taxonomic structure from DNA relationships due to different choice of reference strains. *Syst Appl Microbiol* **10**: 241–250.
- Hartmann, R., Sickinger, H.D. & Oesterhelt, D.** (1980). Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3821–3825.
- Hatori, Y., Sato, M., Orishimo, K., Yatsunami, R., Endo, K., Fukui, T. & Nakamura, S.** (2006). Characterization of recombinant family 18 chitinase from extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* strain NRC-1. *Chitin Chitosan Res* **12**: 201.
- Hawley, E.R. & Hess, M.** (2014). Metagenome sequencing of the prokaryotic microbiota of the hypersaline and meromictic Soap Lake, Washington. *Genome Announc* **2**: e01212-13.
- Hawley, E.R., Schackwitz, W. & Hess, M.** (2014). Metagenomic sequencing of two Salton sea microbiomes. *Genome Announc* **2**: e01208-13.
- Hirschler-Réa, A., Matheron, R., Riffaud, C., Mouné, S., Eatock, C., Herbert, R.A., Willison, J.C. & Caumette, P.** (2003). Isolation and characterization of spirilloid purple phototrophic bacteria forming red layers in microbial mats of Mediterranean salterns: Description of *Halorhodospira neutriphila* sp. nov. and emendation of the genus *Halorhodospira*. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 153–163.
- Hochstein, L.I.** (1988). The physiology and metabolism of the extremely halophilic bacteria. In: Rodríguez-Valera, F. (eds), *Halophilic Bacteria*, CRC Press, Boca Raton, pp. 67–83.
- Hochstein, L.I.** (1978). Carbohydrate metabolism in the extremely halophilic bacteria: the role of glucose in the regulation of citrate synthase activity. In: Caplan, S.R. and Ginzburg, M. (eds), *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, Elsevier, Amsterdam, pp. 397–412.
- Hochstein, L.I., Dalton, B.P. & Pollock, G.** (1976) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: identification of galactonic acid as a product of galactose metabolism. *Can J Microbiol* **22**: 1191–1196.
- Hochstein, L.I. & Lang, F.** (1991). Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans*. *Arch Biochem Biophys* **288**: 380–385.
- Hochstein, L.I. & Tomlinson, G.A.** (1985). Denitrification by extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **27**: 329–331.
- Hoffmann, T., Wensing, A., Brosius, M., Steil, L., Völker, U. & Bremer, E.** (2013). Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *J Bacteriol* **195**: 510–522.
- Holding, A.J. & Colle, J.G.** (1971). Routine biochemical test. In: Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (eds), *Methods in Microbiology*, Academic Press, London, pp. 1–32.

- Hollister, E.B., Engledow, A.S., Hammett, A.J.M., Provin, T.L., Wilkinson, H.H. & Gentry, T.J. (2010). Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *ISME J* **4**: 829–838.
- Holtmann, G. & Bremer, E. (2004). Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by exogenously provided glycine betaine and structurally related compatible solutes: involvement of Opu transporters. *J Bacteriol* **186**: 1683–1693.
- Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A.T., Robb, F.T. & Stetter, K.O. (eds) (2011). *Extremophiles Handbook*. Springer, Tokyo.
- Hung, K.S., Liu, S.M., Tzou, W.S., Lin, F.P., Pan, C.L., Fang, T.Y., Sun, K.H. & Tang, S.J. (2011). Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Process Biochem* **46**: 1257–1263.
- Hutcheon, G.W., Vasisht, N. & Bolhuis, A. (2005). Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles* **9**: 487–495.
- Huynen, M.A., Dandekar, T. & Bork, P. (1999). Variation and evolution of the citric-acid cycle: a genomic perspective. *Trends Microbiol* **7**: 281–291.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W. & Hauser, L.J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 119.
- Hyatt, D., LoCascio, P.F., Hauser, L.J. & Uberbacher, E.C. (2012). Gene and translation initiation site prediction in metagenomic sequences. *Bioinformatics* **28**: 2223–2230.
- I
- Imhoff, J.F., Sahl, H.G., Soliman, G.S.H. & Trüper, H.G. (1979). The Wadi Natrun: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiol J* **1**: 219–234.
- Imhoff, J.F. & Trüper, H.G. (1977). *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. *Arch Microbiol* **114**: 115–121.
- Infante-Domínguez, C., Corral, P., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2015). *Halovenus salina* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 3016–3023.
- Irshad, A., Ahmad, I. & Kim, S.B. (2014). Culturable diversity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Brazilian J Microbiol* **45**: 563–571.

Isaji, Y., Kawahata, H., Ogawa, N.O., Kuroda, J., Yoshimura, T., Jiménez-Espejo, F.J., Makabe, A., Shibuya, T., Lugli, S., Santulli, A., Manzi, V., Roveri, M. & Ohkouchi, N. (2019). Efficient recycling of nutrients in modern and past hypersaline environments. *Sci Rep* **9**: 3718.

IUSS Working Group WRB. (2007). *World reference base for soil resources 2006, first update* Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

J

Jacob, J.H., Hussein, E.I., Shakhathreh, M.A.K. & Cornelison, C.T. (2017). Microbial community analysis of the hypersaline water of the Dead Sea using high-throughput amplicon sequencing. *Microbiology Open* **6**: e500.

Jančič, S., Frisvad, J.C., Koccev, D., Gostinčar, C., Džeroski, S. & Gunde-Cimerman, N. (2016). Production of secondary metabolites in extreme environments: food- and airborne *Wallemia* sp. produce toxic metabolites at hypersaline conditions. *PLoS One* **11**: e0169116.

Jančič, S., Nguyen, H.D.T., Frisvad, J.C., Zalar, P., Schroers, H.-J., Seifert, K.A. & Gunde-Cimerman, N. (2015). A taxonomic revision of the *Wallemia sebi* species complex. *PLoS One* **10**: e0125933.

Javor, B. (1989). *Hypersaline environments: Microbiology and Biogeochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Jeffries, C.D., Holtman, D.F. & Guse, D.G. (1957). Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J Bacteriol* **73**: 590–591.

Jensen, M.W., Matlock, S.A., Reinheimer, C.H., Lawlor, C.J., Reinheimer, T.A. & Gorrell, A. (2015). Potassium stress growth characteristics and energetics in the haloarchaeon *Haloarcula marismortui*. *Extremophiles* **19**: 315–325.

Johnsen, U. & Schönheit, P. (2004). Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *J Bacteriol* **186**: 6198–6207.

Johnsen, U., Selig, M., Xavier, K.B., Santos, H. & Schönheit, P. (2001). Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*. *Arch Microbiol* **175**: 52–61.

Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W. & Owenson, G.G. (1998). Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* **2**: 191–200.

Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (eds), *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, 21–132.

K

- Kall, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E.L.L.** (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res* **35**: W429–W432.
- Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R.R., Smith, D.C. & D'Hondt, S.** (2012). Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 16213–16216.
- Kalwasińska, A., Deja-Sikora, E., Szabó, A., Felföldi, T., Kosobucki, P., Brzezinska, M.S. & Walczak, M.** (2019). Salino-alkaline lime of anthropogenic origin a reservoir of diverse microbial communities. *Sci Total Environ* **655**: 842–854.
- Kambourova, M., Tomova, I., Boyadzhieva, I., Radchenkova, N. & Vasileva-Tonkova, E.** (2017). Phylogenetic analysis of the bacterial community in a crystallizer pond, Pomorie salterns, Bulgaria. *Biotechnol Biotechnol Equip* **31**: 325–332.
- Kambura, A.K., Mwirichia, R.K., Kasili, R.W., Karanja, E.N., Makonde, H.M. & Boga, H.I.** (2016). *Bacteria* and *Archaea* diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya. *BMC Microbiol* **16**: 136.
- Kamekura, M.** (1998). Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* **2**: 289–295.
- Kamekura, M., Dyll-Smith, M.L., Upasani, V., Ventosa, A. & Kates, M.** (1997). Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii*, and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba*, and *Natronomonas* gen. nov., respectively, as *Halorubrum vacuolatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov., and *Natronomonas pharaonis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 853–857.
- Kanapathipillai, M., Lentzen, G., Sierks, M. & Park, C.B.** (2005). Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid. *FEBS Lett* **579**: 4775–4780.
- Kanehisa, M., Sato, Y. & Morishima, K.** (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol* **428**: 726–731.
- Kastritis, P.L., Papandreou, N.C. & Hamodrakas, S.J.** (2007). Haloadaptation: Insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs. *Int J Biol Macromol* **41**: 447–453.
- Kates, M.** (1993). Membrane lipids of archaea. In: Kate, M., Kushner, D.J. and Matheson, A.T. (eds), *New Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, pp. 261–295.
- Kates, M. (eds)** (1986). *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis, and Identification of Lipids*. Elsevier, Amsterdam ; New York.

- Kato, H.E., Inoue, K., Kandori, H. & Nureki, O.** (2016). The light-driven sodium ion pump: a new player in rhodopsin research. *BioEssays* **38**: 1274–1282.
- Katoh, K. & Standley, D.M.** (2013). MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**: 772–780.
- Kauri, T., Ackermann, H.W., Goel, U. & Kushner, D.J.** (1991). A bacteriophage of a moderately halophilic bacterium. *Arch Microbiol* **156**: 435–438.
- Kauri, T., Wallace, R. & Kushner, D.J.** (1990). Nutrition of the halophilic archaebacterium, *Haloferax volcanii*. *Syst Appl Microbiol* **13**: 14–18.
- Kaurichev, I.S.** (1980). *Prácticas de Edafología*, Mir, Moscow.
- Kempf, B. & Bremer, E.** (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319–330.
- Kerscher, L. & Oesterhelt, D.** (1981a). Purification and properties of two 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. *Eur J Biochem* **116**: 587–594.
- Kerscher, L. & Oesterhelt, D.** (1981b). The catalytic mechanism of 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. One-electron transfer at two distinct steps of the catalytic cycle. *Eur J Biochem* **116**: 595–600.
- Kilmer, B.R., Eberl, T.C., Cunderla, B., Chen, F., Clark, B.C. & Schneegurt, M.A.** (2014). Molecular and phenetic characterization of the bacterial assemblage of Hot Lake, WA, an environment with high concentrations of magnesium sulphate, and its relevance to Mars. *Int J Astrobiol* **13**: 69–80.
- Kim, H.W., Kashima, Y., Ishikawa, K. & Yamano, N.** (2009). Purification and characterization of the first archaeal glutamate decarboxylase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 224–227.
- Kim, J., Enache, E. & Hayman, M.S.E.** (2015). Halophilic and osmophilic microorganisms. In: Salfinger, Y. and Tortorello, M.T. (eds), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. APHA Press, Washington, D.C., pp. 213–222.
- Kim, T.Y., Kim, S.J., Park, S.J., Kim, J.G., Cha, I.T., Jung, M.Y., Lee, S.A., Roh, S.W., Yim, K.J., Itoh, T. & Rhee, S.K.** (2013). *Natronomonas gomsonensis* sp. nov., isolated from a solar saltern. *Antonie van Leeuwenhoek* **104**: 627–635.
- Klappenbach, J.A., Goris, J., Vandamme, P., Coenye, T., Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M.** (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 81–91.
- Klimke, W., Agarwala, R., Badretdin, A., Chetvernin, S., Ciufo, S., Fedorov, B., Kiryutin, B., O'Neill, K., Resch, W., Resenchuk, S., Schafer, S., Tolstoy, I. & Tatusova, T.** (2009). The National Center for Biotechnology Information's protein clusters database.

- Nucleic Acids Res* **37**: D216–D223.
- Kluge, A.G. & Farris, J.S.** (1969). Quantitative phyletics and the evolution of Anurans. *Syst Zool* **18**: 1.
- Koneman, E.W., Allen, D.S., Dowell, V.R. & Sommers, H.M. (eds)** (1983). *Diagnóstico Microbiológico*. Panamericana, Buenos Aires.
- Konstantinidis, K.T., Rosselló-Móra, R. & Amann, R.** (2017). Uncultivated microbes in need of their own taxonomy. *ISME J* **11**: 2399–2406.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M.** (2005a). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 2567–2572.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M.** (2005b). Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J Bacteriol* **187**: 6258–6264.
- Konstantinidis, K.T. & Tiedje, J.M.** (2004). Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3160–3165.
- Köpke, B., Wilms, R., Engelen, B., Cypionka, H. & Sass, H.** (2005). Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7819–7830.
- Koser, S.A.** (1923). Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. *J Bacteriol* **8**: 493–520.
- Kovacs, N.** (1928). Eine vereinfachte methode zum nachweis der indolbildung durch bakterien. *Z Immunitätsforsch* **55**: 311–315.
- Kovacs, N.** (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* **178**: 703.
- Kukkaro, P. & Bamford, D.H.** (2009). Virus-host interactions in environments with a wide range of ionic strengths. *Environ Microbiol Rep* **1**: 71–77.
- Kumar, S. & Punekar, N.S.** (1997). The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol Res* **101**: 403–409.
- Kurth, D., Amadio, A., Ordoñez, O.F., Albarracín, V.H., Gärtner, W. & Farías, M.E.** (2017). Arsenic metabolism in high altitude modern stromatolites revealed by metagenomic analysis. *Sci Rep* **7**: 1024.
- Kushner, D.J. (eds)** (1978). *Life in High Salt and Solute Concentrations: Halophilic Bacteria*. Academic Press, London.
- Kushner, D.J. & Kamekura, M.** (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodríguez-Valera, F. (ed), *Halophilic Bacteria*, vol. I. CRC Press, Boca Raton, pp. 109–138.
- de la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C., Márquez, M.C. & Ventosa, A.** (2011). Taxonomy of

halophiles. In: Horikoshi, K., Antranikian, G., Bull, A.T., Robb, F.T. and Stetter, K.O. (eds), *Extremophiles Handboook*. Springer, Tokyo, pp. 255–309.

de la Vega, M., Sayago, A., Ariza, J., Barneto, A.G. & León, R. (2016). Characterization of a bacterioruberin-producing haloarchaea isolated from the marshlands of the Odiel river in the southwest of Spain. *Biotechnol Prog* **32**: 592–600.

L

Lanyi, J.K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* **38**: 272–290.

Larson, C.A. & Belovsky, G.E. (2013). Salinity and nutrients influence species richness and evenness of phytoplankton communities in microcosm experiments from Great Salt Lake, Utah, USA. *J Plankton Res* **35**: 1154–1166.

Lassmann, T. & Sonnhammer, E. (2005). Kalign—an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics* **6**: 298.

Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. & Gelfand, D.H. (1989). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* **264**: 6427–6437.

Laybourn-Parry, J. & Wadham, J. (2014). *Antarctic Lakes*. Oxford University Press, Oxford.

Le, S.Q. & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* **25**: 1307–1320.

Leadbetter, J.R. (2003). Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* **6**: 274–281.

Lee, E.S., Kim, H.W., Kim, D.E., Kim, Y.H., Nam, S.W., Kim, B.W. & Jeon, S.J. (2013). Gene expression and characterization of thermostable glutamate decarboxylase from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Bioprocess Eng* **18**: 375–381.

Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S.-C. & Chun, J. (2016). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 1100–1103.

de León-Lorenzana, A.S., Delgado-Balbuena, L., Domínguez-Mendoza, C., Navarro-Noya, Y.E., Luna-Guido, M. & Dendooven, L. (2017). Reducing salinity by flooding an extremely alkaline and saline soil changes the bacterial community but its effect on the archaeal community is limited. *Front Microbiol* **8**: 466.

León, M.J., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2017). *Marinobacter aquaticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 2622–2627.

- León, M.J., Vera-Gargallo, B., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2016). *Spiribacter roseus* sp. nov., a moderately halophilic species of the genus *Spiribacter* from salterns. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 4218–4224.
- León, M.J., Fernández, A.B., Ghai, R., Sánchez-Porro, C. & Rodríguez-Valera, F. (2014). From metagenomics to pure culture: isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **80**: 3850–3857.
- León, M.J., Martínez-Checa, F., Ventosa, A. & Sánchez-Porro, C. (2015). *Idiomarina aquatica* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from salterns. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 4595–4600.
- León, M.J., Sánchez-Porro, C., de la Haba, R.R., Llamas, I. & Ventosa, A. (2014). *Larsenia salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halomonadaceae* based on multilocus sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* **37**: 480–487.
- Leonard, A.C. & Mechali, M. (2013). DNA replication origins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a010116–a010116.
- Li, D., Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K. & Lam, T.W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* **31**: 1674–1676.
- Lindemann, S.R., Moran, J.J., Stegen, J.C., Renslow, R.S., Hutchison, J.R., Cole, J.K., Dohnalkova, A.C., Tremblay, J., Singh, K., Malfatti, S.A., Chen, F., Tringe, S.G., Beyenal, H. & Fredrickson, J.K. (2013). The epsomitic phototrophic microbial mat of Hot Lake, Washington: Community structural responses to seasonal cycling. *Front Microbiol* **4**: 323.
- Liu, K., Ding, X., Tang, X., Wang, J., Li, W., Yan, Q. & Liu, Z. (2018). Macro and microelements drive diversity and composition of prokaryotic and fungal communities in hypersaline sediments and saline–alkaline soils. *Front Microbiol* **9**: 352.
- Liu, Y., Priscu, J.C., Xiong, J., Conrad, R., Vick-Majors, T., Chu, H. & Hou, J. (2016). Salinity drives archaeal distribution patterns in high altitude lake sediments on the Tibetan Plateau. *FEMS Microbiol Ecol* **92**: fiw033.
- Llamas, I., Amjres, H., Mata, J.A., Quesada, E. & Béjar, V. (2012). The potential biotechnological applications of the exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas almeriensis*. *Molecules* **17**: 7103–7120.
- Llamas, I., Moral, A. del, Martínez-Checa, F., Arco, Y., Arias, S. & Quesada, E. (2006). *Halomonas maura* is a physiologically versatile bacterium of both ecological and biotechnological interest. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**: 395–403.
- Lledó, B., Martínez-Espinosa, R.M., Marhuenda-Egea, F.C. & Bonete, M.J. (2004).

- Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **1674**: 50–59.
- López-Hermoso, C., de la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C. & Ventosa, A. (2018). *Salinivibrio kushneri* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from salterns. *Syst Appl Microbiol* **41**: 159–166.
- López-Pérez, M., Ghai, R., León, M.J., Rodríguez-Olmos, Á., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. & Rodríguez-Valera, F. (2013). Genomes of ‘*Spiribacter*’, a streamlined, successful halophilic bacterium. *BMC Genomics* **14**: 787.
- Löytynoja, A. (2014). Phylogeny-aware alignment with PRANK. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 155–170.
- Lucena-Padrós, H. & Ruíz-Barba, J.L. (2016). Diversity and enumeration of halophilic and alkaliphilic bacteria in Spanish-style green table-olive fermentations. *Food Microbiol* **53**: 53–62.
- Ludwig, W. & Klenk, H.P. (2001). Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. and Garrrity G.M. (eds), *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, Boston, pp. 49–65.
- Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev* **15**: 155–173.
- Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1999). Phylogeny of *Bacteria* beyond the 16S rRNA standard. *ASM News* **65**: 752–757.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. & Schleifer, K.H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis (review). *Electrophoresis* **19**: 554–568.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, A., Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jacob, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.H. (2004). ARB: s software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**: 1363–1371.
- Lukashin, A. & Borodovsky, M. (1998). GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res* **26**: 1107–1115.
- Luque, R., Béjar, V., Quesada, E. & Llamas, I. (2014). Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Can J Microbiol* **60**: 839–846.
- Luque, R., González-Domenech, C.M., Llamas, I., Quesada, E. & Béjar, V. (2012). Diversity of culturable halophilic archaea isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Extremophiles* **16**: 205–213.

M

- Ma'Or, Z., Meshulam-Simon, G., Yehuda, S., Gavrieli, J.A. & Sea, D.** (2000). Antiwrinkle and skin-moisturizing effects of a mineral-algal-botanical complex. *J Cosmet Sci* **51**: 27–36.
- Ma, Y., Zhang, W., Xue, Y., Zhou, P., Ventosa, A. & Grant, W.D.** (2004). Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses. *Extremophiles* **8**: 45–51.
- Macumber, P.G.** (1992). Hydrological processes in the Tyrrell Basin, southeastern Australia. *Chem Geol* **96**: 1–18.
- Makhdoumi-Kakhki, A., Amoozegar, M.A., Kazemi, B., Paic, L., Ventosa, A., Pašić, L. & Ventosa, A.** (2012). Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes Environ* **27**: 87–93.
- Makhdoumi-Kakhki, A., Amoozegar, M.A. & Ventosa, A.** (2012). *Halovenus aranensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aran-Bidgol salt lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 1331–1336.
- Malik, A.D. & Furtado, I.J.** (2019). Cellulase-free xylanase by *Halococcus thailandensis* GUMFAS7 and *Halorubrum saccharovororum* GUMFAS1—bionts of a sponge *Cinachyrella cavernosa*. *Microbiology* **88**: 212–219.
- Man, D., Wang, W., Sabehi, G., Aravind, L., Post, A.F., Massana, R., Spudich, E.N., Spudich, J.L. & Béjà, O.** (2003). Diversification and spectral tuning in marine proteorhodopsins. *EMBO J* **22**: 1725–1731.
- Mancinelli, R.C. & Hochstein, L.I.** (1986). The occurrence of denitrification in extremely halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **35**: 55–57.
- Mancinelli, R.L., Landheim, R., Sánchez-Porro, C., Dornmayr-Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Legat, A., Ventosa, A., Radax, C., Ihara, K., White, M.R. & Stan-Lotter, H.** (2009). *Halorubrum chaoviator* sp. nov., a haloarchaeon isolated from sea salt in Baja California, Mexico, Western Australia and Naxos, Greece. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 1908–1913.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C. & Bryant, S.H.** (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* **43**: D222–D226.
- Marini, A., Reinelt, K., Krutmann, J. & Bilstein, A.** (2014). Ectoine-containing cream in the treatment of mild to moderate atopic dermatitis: a randomised, comparator-controlled, intra-individual double-blind, multi-center trial. *Skin Pharmacol Physiol* **27**: 57–65.
- Marmur, J.** (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-

- organisms. *J Mol Biol* **3**: 208–218.
- Martin, D.D., Ciulla, R.A. & Roberts, M.F.** (1999). Osmoadaptation in Archaea. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1815–1825.
- Martinelli, L., Zalar, P., Gunde-Cimerman, N., Azua-Bustos, A., Sterflinger, K. & Piñar, G.** (2017). *Aspergillus atacamensis* and *A. salisburgensis*: two new halophilic species from hypersaline/arid habitats with a phialosimplex-like morphology. *Extremophiles* **21**: 755–773.
- Martínez-Espinosa, R.M., Richardson, D.J., Butt, J.N. & Bonete, M.J.** (2006). Respiratory nitrate and nitrite pathway in the denitrifier haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *Biochem Soc Trans* **34**: 115–117.
- Martínez-García, M., Santos, F., Moreno-Paz, M., Parro, V. & Antón, J.** (2014). Unveiling viral-host interactions within the ‘microbial dark matter’. *Nat Commun* **5**: 4542.
- Mascellani, N., Liu, X., Rossi, S., Marchesini, J., Valentini, D., Arcelli, D., Taccioli, C., Citterich, M.H., Liu, C.G., Evangelisti, R., Russo, G., Santos, J.M., Croce, C.M. & Volinia, S.** (2007). Compatible solutes from hyperthermophiles improve the quality of DNA microarrays. *BMC Biotechnol* **7**: 82.
- Mata, J.A., Béjar, V., Llamas, I., Arias, S., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C. & Quesada, E.** (2006). Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. *Res Microbiol* **157**: 827–835.
- Mata, J.A., Bjar, V., Bressollier, P., Tallon, R., Urdaci, M.C., Quesada, E. & Llamas, I.** (2008). Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic Bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. *J Appl Microbiol* **105**: 521–528.
- Máthé, I., Borsodi, A.K., Tóth, E.M., Felföldi, T., Jurecska, L., Krett, G., Kelemen, Z., Elekes, E., Barkács, K. & Márialigeti, K.** (2014). Vertical physico-chemical gradients with distinct microbial communities in the hypersaline and heliothermal Lake Ursu (Sovata, Romania). *Extremophiles* **18**: 501–514.
- Matsuno-Yagi, A. & Mukohata, Y.** (1977). Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun* **78**: 237–243.
- Matsuzaki, M., Kubota, K., Satoh, T., Kunugi, M., Ban, S. & Imura, S.** (2006). Dimethyl sulfoxide-respiring bacteria in Suribati Ike, a hypersaline lake, in Antarctica and the marine environment. *Polar Biosci* **20**: 73–81.
- Medina, E., Ruiz-Bellido, M.A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Montes-Borrego, M., Landa, B.B. & Arroyo-López, F.N.** (2016). Assessment of the bacterial community in directly brined Aloreña de Málaga table olive fermentations by metagenetic analysis. *Int J Food Microbiol* **236**: 47–55.
- Di Meglio, L., Santos, F., Gomariz, M., Almansa, C., López, C., Antón, J. & Nercessian, D.**

- (2016). Seasonal dynamics of extremely halophilic microbial communities in three Argentinian salterns. *FEMS Microbiol Ecol* **92**: fiw184.
- Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.-P. & Göker, M.** (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* **14**: 60.
- Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., Heinrich, R. & Montero, F.** (1997). Theoretical Approaches to the evolutionary optimization of glycolysis. *Chemical Analysis. Eur J Biochem* **244**: 527–543.
- Mellado, E., Moore, E.R., Nieto, J.J. & Ventosa, A.** (1996). Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Vibrio costicola* strains: description of *Salinivibrio costicola* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **46**: 817–821.
- Mellado, E. & Ventosa, A.** (2003). Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. In: Barredo, J. (ed), *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production*. Research Signpost, Kerala, India, pp- 233-256.
- Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benammar, L., Benhadj, M., Ayachi, A., Hacène, H., Gonzalez-Paredes, A. & Aguilera, M.** (2019). Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: a source of promising features and potentialities. *World J Microbiol Biotechnol* **35**: 132.
- Mesbah, N.M. & Wiegel, J.** (2008). Life at extreme limits. *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 44–57.
- Mesbah, N.M. & Wiegel, J.** (2012). Life under multiple extreme conditions: diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Appl Environ Microbiol* **78**: 4074–4082.
- Michael, A.J.** (2018). Polyamine function in archaea and bacteria. *J Biol Chem* **293**: 18693–18701.
- Miller, J.R., Koren, S. & Sutton, G.** (2010). Assembly algorithm for next-generation sequencing data. *Genomics* **95**: 315–327.
- Minegishi, H., Kamekura, M., Itoh, T., Echigo, A., Usami, R. & Hashimoto, T.** (2010). Further refinement of the phylogeny of the *Halobacteriaceae* based on the full-length RNA polymerase subunit B' (rpoB') gene. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 2398–2408.
- Mizuno, C.M., Prajapati, B., Lucas-Staat, S., Sime-Ngando, T., Forterre, P., Bamford, D.H., Prangishvili, D., Krupovic, M. & Oksanen, H.M.** (2019). Novel haloarchaeal viruses from Lake Retba infecting *Haloferax* and *Halorubrum* species. *Environ Microbiol* **21**: 2129–2147.
- Mongodin, E.F., Nelson, K.E., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D.A., Papke, R.T., Sánchez-Perez, G., Sharma, A.K., Nesbo, C.L., MacLeod, D., Baptiste, E., Doolittle, W.F., Charlebois, R.L., Legault, B. & Rodríguez-Valera, F.** (2005). The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among

- hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18147–18152.
- Moore, S.J. & Warren, M.J.** (2012). The anaerobic biosynthesis of vitamin B₁₂. *Biochem Soc Trans* **40**: 581–586.
- Mora-Ruiz, M. de R., Cifuentes, A., Font-Verdera, F., Pérez-Fernández, C., Farias, M.E., González, B., Orfila, A. & Rosselló-Móra, R.** (2018). Biogeographical patterns of bacterial and archaeal communities from distant hypersaline environments. *Syst Appl Microbiol* **41**: 139–150.
- Moreno, M. de L., García, M.T., Ventosa, A., Iglesias-Guerra, F. & Mellado, E.** (2010). The extremely halophilic bacterium *Salicola marasensis* IC10 accumulates the compatible solute betaine. *Syst Appl Microbiol* **33**: 308–310.
- Morris, J.J.** (2015). Black Queen evolution: the role of leakiness in structuring microbial communities. *Trends Genet* **31**: 475–482.
- Morris, M.S.** (2012). The Role of B vitamins in preventing and treating cognitive impairment and decline. *Adv Nutr* **3**: 801–812.
- Mosier, A.C., Murray, A.E. & Fritsen, C.H.** (2007). Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* **59**: 274–288.
- Mota, R.R., Márquez, M.C., Arahal, D.R., Mellado, E. & Ventosa, A.** (1997). Polyphasic taxonomy of *Nesterenkonia halobia*. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1231–1235.
- Mou, Y.Z., Qiu, X.X., Zhao, M.L., Cui, H.L., Oh, D. & Dyll-Smith, M.L.** (2012). *Halohasta litorea* gen. nov. sp. nov., and *Halohasta litchfieldiae* sp. nov., isolated from the Daliang aquaculture farm, China and from Deep Lake, Antarctica, respectively. *Extremophiles* **16**: 895–901.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: Diego, R.W. (ed), *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego, pp. 335–350.
- Munns, R. & Tester, M.** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651–681.
- Murray, A.E., Kenig, F., Fritsen, C.H., McKay, C.P., Cawley, K.M., Edwards, R., Kuhn, E., Mcknight, D.M., Ostrom, N.E., Peng, V., Ponce, A., Priscu, J.C., Samarkin, V., Townsend, A.T., Wagh, P., Young, S.A., To, P. & Doran, P.T.** (2012) Microbial life at -13°C in the brine of an ice-sealed Antarctic lake. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 2–7.
- Mutlu, M.B. & Güven, K.** (2015). Bacterial diversity in Çamalti saltern, Turkey. *Polish J Microbiol* **64**: 37–45.

N

- Naganuma, T., Hua, P.N., Okamoto, T., Ban, S., Imura, S. & Kanda, H.** (2005). Depth distribution of euryhaline halophilic bacteria in Suribati Ike, a meromictic lake in East Antarctica. *Polar Biol* **28**: 964–970.
- Nagarajan, N. & Pop, M.** (2013). Sequence assembly demystified. *Nat Rev Genet* **14**: 157–167.
- Naghoni, A., Emtiazi, G., Amoozegar, M.A., Cretoiu, M.S., Stal, L.J., Etemadifar, Z., Shahzadeh Fazeli, S.A. & Bolhuis, H.** (2017) Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran. *Sci Rep* **7**: 11522.
- Najafi, M.F., Deobagkar, D. & Deobagkar, D.** (2005). Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electron J Biotechnol* **8**: 79–85.
- Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N. & Esumi, M.** (2016). Pitfalls of DNA quantification using DNA-Binding fluorescent dyes and suggested solutions. *PLoS One* **11**: e0150528.
- Narasingarao, P., Podell, S., Ugalde, J.A., Brochier-Armanet, C., Emerson, J.B., Brocks, J.J., Heidelberg, K.B., Banfield, J.F. & Allen, E.E.** (2012) De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *ISME J* **6**: 81–93.
- Narayan, A., Patel, V., Singh, P., Patel, A., Jain, K., Karthikeyan, K., Shah, A. & Madamwar, D.** (2018). Response of microbial community structure to seasonal fluctuation on soils of Rann of Kachchh, Gujarat, India: representing microbial dynamics and functional potential. *Ecol Genet Genomics* **6**: 22–32.
- Nau-Wagner, G., Boch, J., Le Good, J.A. & Bremer, E.** (1999). High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 560–568.
- Navarro-Noya, Y.E., Valenzuela-Encinas, C., Sandoval-Yuriar, A., Jiménez-Bueno, N.G., Marsch, R. & Dendooven, L.** (2015). Archaeal communities in a heterogeneous hypersaline-alkaline soil. *Archaea* **2015**: 646820.
- Nawrocki, E.P.** (2009) Structural RNA Homology Search and Alignment using Covariance Models. *PhD thesis*. Washington University.
- Nelson-Sathi, S., Dagan, T., Landan, G., Janssen, A., Steel, M., McInerney, J.O., Deppenmeier, U. & Martin, W.F.** (2012). Acquisition of 1,000 eubacterial genes physiologically transformed a methanogen at the origin of haloarchaea. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 20537–20542.
- Ngugi, D.K., Blom, J., Stepanauskas, R. & Stingl, U.** (2016). Diversification and niche adaptations of *Nitrospina*-like bacteria in the polyextreme interfaces of Red Sea brines. *ISME J* **10**: 1383–1399.

- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A. & Minh, B.Q.** (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* **32**: 268–274.
- Nichols, D.** (2007). Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 351–357.
- Nishihara, M., Yamazaki, T., Oshima, T. & Koga, Y.** (1999). sn-glycerol-1-phosphate-forming activities in *Archaea*: separation of archaeal phospholipid biosynthesis and glycerol catabolism by glycerophosphate enantiomers. *J Bacteriol* **181**: 1330–1333.
- Nissenbaum, A.** (1975). The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microb Ecol* **2**: 139–161.

O

- Oesterhelt, D.** (1982). Anaerobic growth of halobacteria. *Methods Enzymol* **88**: 417–420.
- Oesterhelt, D. & Krippahl, G.** (1983). Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. *Ann l'Institut Pasteur / Microbiol* **134**: 137–150.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W.** (1973). Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 2853–2857.
- Oesterhelt, D. & Stoeckenius, W.** (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat New Biol* **233**: 149–152.
- Oh, D., Porter, K., Russ, B., Burns, D. & Dyll-Smith, M.** (2010). Diversity of *Haloquadratum* and other haloarchaea in three, geographically distant, Australian saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* **14**: 161–169.
- Olson, N.D., Treangen, T.J., Hill, C.M., Cepeda-Espinoza, V., Ghurye, J., Koren, S. & Pop, M.** (2017). Metagenomic assembly through the lens of validation: recent advances in assessing and improving the quality of genomes assembled from metagenomes. *Brief Bioinform* **20**: 1140–1150.
- Ondov, B.D., Bergman, N.H. & Phillippy, A.M.** (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* **12**: 385.
- Orellana, M. V., Pang, W.L., Durand, P.M., Whitehead, K. & Baliga, N.S.** (2013). A role for programmed cell death in the microbial loop. *PLoS One* **8**: e62595.
- Oren, A.** (1983). Population dynamics of halobacteria in the Dead Sea water column. *Limnol Oceanogr* **28**: 1094–1103.
- Oren, A.** (1988). The microbial ecology of the Dead Sea. In: Marshall, K.C. (ed), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 10. Plenum Publishing, New York, pp. 193–229.

- Oren, A.** (1994). The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev* **13**: 415–440.
- Oren, A.** (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 334–348.
- Oren, A.** (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 56–63.
- Oren, A.** (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems* **1**: 2.
- Oren, A. (ed)** (2006a). *Halophilic Microorganisms and their Environments*. Springer Science & Business Media, Berlín.
- Oren, A.** (2006b). The order *Halobacteriales*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. (eds), *The Prokaryotes*. Springer, Berlín, pp. 113–164.
- Oren, A.** (2006c). Two and a half centuries of qualitative and quantitative chemical analyses of Dead Sea water. *Isr J Chem* **46**: 69–77.
- Oren, A.** (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **4**: 2.
- Oren, A.** (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol* **31**: 825–834.
- Oren, A.** (2011a). Diversity of halophiles. In: Horikoshi, K. (ed), *Extremophiles Handbook*. Springer, Tokyo, pp. 309–325.
- Oren, A.** (2011b). Ecology of halophiles. In: Horikoshi, K. (ed), *Extremophiles Handbook*. Springer, Tokyo, pp. 343–361.
- Oren, A.** (2011c). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* **13**: 1908–1923.
- Oren, A.** (2013). Life in magnesium- and calcium-rich hypersaline environments: salt stress by chaotropic ions. In: Seckbach, J., Oren, A., Stan-Lotter, H. (eds), *Polyextremophiles. Cellular origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer, Dordrecht, pp. 215–232.
- Oren, A.** (2014). The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *J Biol Res* **21**: 23.
- Oren, A.** (2015). Halophilic microbial communities and their environments. *Curr Opin Biotechnol* **33**: 119–124.
- Oren, A., Arahall, D.R. & Ventosa, A.** (2009). Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 637–642.
- Oren, A., Gavrieli, I., Gavrieli, J., M, K., Latí, J. & Aharoni, M.** (2005). Microbial communities in the Dead sea - Past, present and future. In: Gunde-Cimerman, N., Oren, A. and

- Plemenitaš, A. (eds), *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, Springer, Dordrecht, pp. 27–39.
- Oren, A. & Gurevich, P. (1994). Production of d-lactate, acetate, and pyruvate from glycerol in communities of halophilic archaea in the Dead Sea and in saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol* **14**: 147–155.
- Oren, A. & Trüper, H.G. (1990). Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of dimethylsulfoxide and trimethylamine N -oxide. *FEMS Microbiol Lett* **70**: 33–36.
- Oren, A. & Ventosa, A. (2019). International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Halobacteria* and subcommittee on the taxonomy of *Halomonadaceae*. Minutes of the joint open meeting, 26 June 2019, Cluj-Napoca, Romania. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**: 3657–3661.
- Oren, A. & Ventosa, A. (2016). International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Halobacteriaceae* and subcommittee on the taxonomy of *Halomonadaceae*. Minutes of the joint open meeting, 23 May 2016, San Juan, Puerto Rico. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 4291–4295.
- Oren, A., Ventosa, A. & Grant, W.D. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the Order *Halobacteriales*. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 233–238.
- Oren, A., Ventosa, A. & Kamekura, M. (2017). *Halobacteria*. In: Whitman, W. (ed), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, West Sussex, pp. 1–5.
- Oueriaghli, N., Béjar, V., Quesada, E. & Martínez-Checa, F. (2013). Molecular ecology techniques reveal both spatial and temporal variations in the diversity of archaeal communities within the athalassohaline environment of Rambla Salada, Spain. *Microb Ecol* **66**: 297–311.
- Oueriaghli, N., Castro, D.J., Llamas, I., Béjar, V. & Martínez-Checa, F. (2018). Study of bacterial community composition and correlation of environmental variables in Rambla Salada, a hypersaline environment in South-Eastern Spain. *Front Microbiol* **9**: 1377.
- Oueriaghli, N., González-Domenech, C.M., Martínez-Checa, F., Muyzer, G., Ventosa, A., Quesada, E. & Béjar, V. (2014). Diversity and distribution of *Halomonas* in Rambla Salada, a hypersaline environment in the southeast of Spain. *FEMS Microbiol Ecol* **87**: 460–474.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J. V, Chuang, H.-Y., Cohoon, M., de Crécy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., Fonstein, M., Frank, E.D., Gerdes, S., Glass, E.M., Goesmann, A., Hanson, A., Iwata-Reuyl, D., Jensen, R., Jamshidi, N., Krause, L., Kubal, M., Larsen, N., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Neuweeger, H.,

Olsen, G., Olson, R., Osterman, A., Portnoy, V., Pusch, G.D., Rodionov, D.A., Rückert, C., Steiner, J., Stevens, R., Thiele, I., Vassieva, O., Ye, Y., Zagnitko, O. & Vonstein, V. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* **33**: 5691–5702.

Overmann, J. (2010). Novel cultivation strategies for environmentally important microorganisms. In: Barton, L., Mandl, M. and Loy A. (eds), *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Springer, Dordrecht, pp. 69–89.

Ozcan, B., Ozyilmaz, G., Cokmus, C. & Caliskan, M. (2009). Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophilic archaeal strains. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**: 105–110.

P

Pagaling, E., Haigh, R.D., Grant, W.D., Cowan, D.A., Jones, B.E., Ma, Y., Ventosa, A. & Heaphy, S. (2007). Sequence analysis of an archaeal virus isolated from a hypersaline lake in Inner Mongolia, China. *BMC Genomics* **8**: 410.

Pagaling, E., Wang, H., Venables, M., Wallace, A., Grant, W.D., Cowan, D.A., Jones, B.E., Ma, Y., Ventosa, A. & Heaphy, S. (2009). Microbial biogeography of six salt lakes in Inner Mongolia, China, and a salt lake in Argentina. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5750–5760.

Pandit, A.S., Joshi, M.N., Bhargava, P., Shaikh, I., Ayachit, G.N., Raj, S.R., Saxena, A.K. & Bagatharia, S.B. (2015). A snapshot of microbial communities from the Kutch: one of the largest salt deserts in the world. *Extremophiles* **19**: 973–987.

Panosyan, H., Hakobyan, A., Birkeland, N.-K. & Trchounian, A. (2018). Bacilli community of saline–alkaline soils from the Ararat Plain (Armenia) assessed by molecular and culture-based methods. *Syst Appl Microbiol* **41**: 232–240.

Papke, R.T., Koenig, J.E., Rodríguez-Valera, F. & Doolittle, W.F. (2004). Frequent recombination in a saltern population of *Halorubrum*. *Science* **306**: 1928–1929.

Papke, R.T., White, E., Reddy, P., Weigel, G., Kamekura, M., Minegishi, H., Usami, R. & Ventosa, A. (2011). A multilocus sequence analysis approach to the phylogeny and taxonomy of the *Halobacteriales*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2984–2995.

Pardue, M.L. & Gall, J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* **64**: 600–604.

Park, K.B. & Oh, S.H. (2007). Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresour Technol* **98**: 312–319.

Park, Y.C. & Park, D.H. (2016). Making soy sauce using direct fermentation of defatted

- soybean meal without the meju (soybean Koji) preparation process. *Food Sci Biotechnol* **25**: 777–784.
- Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P. & Tyson, G.W.** (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* **25**: 1043–1055.
- Parte, A.C.** (2014). LPSN List of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* **42**: 613–616.
- Pascual, J., Macián, M.C., Arahál, D.R., Garay, E. & Pujalte, M.J.** (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 154–165.
- Pašić, L., Bartual, S.G., Ulrih, N.P., Grabnar, M. & Velikonja, B.H.** (2005). Diversity of halophilic archaea in the crystallizers of an Adriatic solar saltern. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 491–498.
- Pašić, L., Ulrih, N.P., Crnigoj, M., Grabnar, M. & Velikonja, B.H.** (2007). Haloarchaeal communities in the crystallizers of two Adriatic solar salterns. *Can J Microbiol* **53**: 8–18.
- Pastor, J.M., Salvador, M., Argandoña, M., Bernal, V., Reina-Bueno, M., Csonka, L.N., Iborra, J.L., Vargas, C., Nieto, J.J. & Cánovas, M.** (2010). Ectoine in cell stress protection: uses and biotechnological production. *Biotechnol Adv* **28**: 782–801.
- Patel, R., Mevada, V., Prajapati, D., Dudhagara, P., Koringa, P. & Joshi, C.G.** (2015). Metagenomic sequence of saline desert microbiota from wild ass sanctuary, Little Rann of Kutch, Gujarat, India. *Genomics Data* **3**: 137–139.
- Paul, D., Kumbhare, S. V., Mhatre, S.S., Chowdhury, S.P., Shetty, S.A., Marathe, N.P., Bhute, S. & Shouche, Y.S.** (2016). Exploration of microbial diversity and community structure of Lonar Lake: The only hypersaline meteorite crater lake within basalt rock. *Front Microbiol* **6**: 1553.
- Paul, S., Bag, S.K., Das, S., Harvill, E.T. & Dutta, C.** (2008). Molecular signature of hypersaline adaptation: Insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biol* **9**: R70.
- Pecher, W.T., Kim, J.-M., DasSarma, P., Karan, R., Sinnis, P. & DasSarma, S.** (2016). *Halobacterium* expression system for production of full-length *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. In: Rampelotto, P. (ed), *Biotechnology of Extremophiles*. Springer, Cham, pp. 699–709.
- Pedrós-Alió, C.** (2005). Diversity of microbial communities: the case of solar salterns. In: Gunde-Cimerman, N., Oren, A. and Plemenitaš, A. (eds), *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer, Dordrecht, pp. 71–90.
- Pedrós-Alió, C., Calderón-Paz, J.I., MacLean, M.H., Medina, G., Marrasé, C., Gasol, J.M. &**

- Guixa-Boixereu, N.** (2000). The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 143–155.
- Pérez, D., Martín, S., Fernández-Lorente, G., Filice, M., Guisán, J.M., Ventosa, A., García, M.T. & Mellado, E.** (2011). A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS One* **6**: e23325.
- Pesenti, P.T., Sikaroodi, M., Gillevet, P.M., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. & Litchfield, C.D.** (2008). *Halorubrum californiense* sp. nov., an extreme archaeal halophile isolated from a crystallizer pond at a solar salt plant in California, USA. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 2710–2715.
- Phadwal, K. & Singh, P.K.** (2003). Isolation and characterization of an indigenous isolate of *Dunaliella* sp. for β -carotene and glycerol production from a hypersaline lake in India. *J Basic Microbiol* **43**: 423–429.
- Pinhassi, J., DeLong, E.F., Béjà, O., González, J.M. & Pedrós-Alió, C.** (2016). Marine bacterial and archaeal ion-pumping rhodopsins: genetic diversity, physiology, and ecology. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**: 929–954.
- Plominsky, A.M., Delherbe, N., Ugalde, J.A., Allen, E.E., Blanchet, M., Ikeda, P., Santibañez, F., Hanselmann, K., Ulloa, O., De la Iglesia, R., von Dassow, P., Astorga, M., Gálvez, M.J., González, M.L., Henríquez-Castillo, C., Vaultot, D., Lopes do Santos, A., van den Engh, G., Gimpel, C., Bertoglio, F., Delgado, Y., Docmac, F., Elizondo-Patrone, C., Narváez, S., Sorroche, F., Rojas-Herrera, M. & Trefault, N.** (2014). Metagenome sequencing of the microbial community of a solar saltern crystallizer pond at Cahuil Lagoon, Chile. *Genome Announc* **2**: e01172-14.
- Podell, S., Emerson, J.B., Jones, C.M., Ugalde, J.A., Welch, S., Heidelberg, K.B., Banfield, J.F. & Allen, E.E.** (2014). Seasonal fluctuations in ionic concentrations drive microbial succession in a hypersaline lake community. *ISME J* **8**: 979–990.
- Podell, S., Ugalde, J. a., Narasingarao, P., Banfield, J.F., Heidelberg, K.B. & Allen, E.E.** (2013). Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem. *PLoS One* **8**: e61692.
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G.R. & Nicolaus, B.** (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by *Archaea*. *Archaea* **2011**: 13.
- Pontefract, A., Zhu, T.F., Walker, V.K., Hepburn, H., Lui, C., Zuber, M.T., Ruvkun, G. & Carr, C.E.** (2017). Microbial diversity in a hypersaline sulfate lake: a terrestrial analog of ancient Mars. *Front Microbiol* **8**: 1819.
- Portero, L.R., Alonso-Reyes, D.G., Zannier, F., Vazquez, M.P., Farías, M.E., Gärtner, W. & Albarracín, V.H.** (2019). Photolyases and cryptochromes in UV-resistant bacteria from high-altitude Andean lakes. *Photochem Photobiol* **95**: 315–330.

- Post, F.J.** (1977). The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb Ecol* **3**: 143–165.
- Prakash, O., Shouche, Y., Jangid, K. & Kostka, J.E.** (2013). Microbial cultivation and the role of microbial resource centers in the omics era. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 51–62.
- Price, M.N., Dehal, P.S. & Arkin, A.P.** (2010). FastTree 2 – approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**: e9490.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. & Glockner, F.O.** (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**: 7188–7196.
- Pushkarev, A. & Béjà, O.** (2016). Functional metagenomic screen reveals new and diverse microbial rhodopsins. *ISME J* **10**: 2331–2335.

Q

- Quesada, E., Bejar, V., Valderrama, M.J., Ventosa, A. & Ramos CORMENZANA, A.R.** (1985). Isolation and characterization of moderately halophilic nonmotile rods from different saline habitats. *Microbiologia* **1**: 89–96.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Megías, L. & Ramos-CORMENZANA, A.** (1983). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative bacteria from hypersaline soils. *Microbiology* **129**: 2649–2657.
- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F. & Ramos-CORMENZANA, A.** (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J Appl Bacteriol* **53**: 155–161.

R

- Radchenkova, N., Boyadzhieva, I., Atanasova, N., Poli, A., Finore, I., Di Donato, P., Nicolaus, B., Panchev, I., Kuncheva, M. & Kambourova, M.** (2018). Extracellular polymer substance synthesized by a halophilic bacterium *Chromohalobacter canadensis* 28. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 4937–4949.
- Ramos-Barbero, M.D., Martín-Cuadrado, A.B., Viver, T., Santos, F., Martínez-García, M. & Antón, J.** (2019). Recovering microbial genomes from metagenomes in hypersaline environments: the good, the bad and the ugly. *Syst Appl Microbiol* **42**: 30–40.
- Ramos-CORMENZANA, A.** (1989). Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms. In: Da Costa, M.S., Duarte, J.C. and Williams, R.A.D. (eds), *Microbiology of Extreme Environments and its Potential for Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London, pp. 289–309.

- Ramos-Barbero, M.D., Martínez, J.M., Almansa, C., Rodríguez, N., Villamor, J., Gomariz, M., Escudero, C., Rubin, S. dC, Antón, J., Martínez-García, M. & Amils, R. (2019). Prokaryotic and viral community structure in the singular chaotropic salt lake Salar de Uyuni. *Environ Microbiol* **21**: 2029–2042.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 597–635.
- Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L. & Giovannoni, S.J. (2002). Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* **418**: 630–633.
- Rath, K.M., Fierer, N., Murphy, D. V. & Rousk, J. (2019). Linking bacterial community composition to soil salinity along environmental gradients. *ISME J* **13**: 836–846.
- Raux, E., Schubert, H.L., Roper, J.M., Wilson, K.S. & Warren, M.J. (1999). Vitamin B₁₂: Insights into biosynthesis's mount improbable. *Bioorg Chem* **27**: 100–118.
- Rawal, N., Kelkar, S.M. & Altekar, W. (1988). Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaebacteria. *Indian J Biochem Biophys* **25**: 674–86.
- Raymond, J.C. & Sistrom, W.R. (1969). *Ectothiorhodospira halophila*: A new species of the genus *Ectothiorhodospira*. *Arch Mikrobiol* **69**: 121–126.
- Reasoner, D.J. & Geldreich, E.E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* **49**: 1-7
- Reitzer, L. (2005). Catabolism of amino acids and related compounds. *EcoSal Plus* **1**: doi: 10.1128/ecosalplus.3.4.7.
- Ren, M., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, Z., Chen, D., Zeng, H., Zhao, S., Chen, L., Hu, Y., Zhang, C., Liang, Y., She, Q., Zhang, Y. & Peng, N. (2018). Diversity and contributions to nitrogen cycling and carbon fixation of soil salinity shaped microbial communities in Tarim Basin. *Front Microbiol* **9**: 431.
- Rhoades, J.D., Chanduvi, F. & Lesch, S. (1999). *Soil Salinity Assessment. Methods and Interpretation of Electrical Conductivity Measurements*, Rome: FAO.
- Rhodes, M.E., Oren, A. & House, C.H. (2012). Dynamics and persistence of Dead Sea microbial populations as shown by high-throughput sequencing of rRNA. *Appl Environ Microbiol* **78**: 2489–2492.
- Rice, P., Longden, L. & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* **16**: 276-277
- Richards, L. ed. (1954). *US Salinity Laboratory Staff. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils*. Agriculture Handbook No. 60, rev. ed. US Govt. Printing Office, Washington.
- Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the

- prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19126–19131.
- Riggs, M.G. & McLachlan, A.** (1986). A simplified screening-procedure for large numbers of plasmid mini-preparations. *Biotechniques* **4**: 310–313.
- Roberts, M.F.** (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **1**: 5.
- Rodionov, D.A., Vitreschak, A.G., Mironov, A.A. & Gelfand, M.S.** (2003). Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. *J Biol Chem* **278**: 41148–59.
- Rodríguez-Brito, B., Li, L., Wegley, L., Furlan, M., Angly, F., Breitbart, M., Buchanan, J., Desnues, C., Dinsdale, E., Edwards, R., Felts, B., Haynes, M., Liu, H., Lipson, D., Mahaffy, J., Martín-Cuadrado, A.B., Mira, A., Nulton, J., Pašić, L., Rayhawk, S., Rodríguez-Mueller, J., Rodríguez-Valera, F., Salamon, P., Srinagesh, S., Thingstad, T.F., Tran, T., Thurber, R.V., Willner, D., Youle, M. & Rohwer, F.** (2010). Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *ISME J* **4**: 739–751.
- Rodríguez-R, L.M. & Konstantinidis, K.T.** (2016). The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Prepr* **4**: e1900v1
- Rodríguez-R, L.M. & Konstantinidis, K.T.** (2014). Bypassing cultivation to identify bacterial species. *Microbe* **9**: 111–118.
- Rodríguez-Valera, F.** (1992). Biotechnological potential of halobacteria. In: Danson, M.J., Hough, D.W. and Lunt, G.G. (eds), *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. Plenum Press, London, pp. 135–147.
- Rodríguez-Valera, F.** (1988). Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. In: Rodríguez-Valera, F. (ed), *Halophilic Bacteria* vol. 1, CRC Press, Boca Raton, pp. 3–30.
- Rodríguez-Valera, F., Ruíz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A.** (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol* **7**: 235–243.
- Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. & Imhoff, J.F.** (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microb Ecol* **11**: 107–115.
- Rodríguez-Valera, F.** (1993). Introduction to saline environments. In: Vreeland, R.H. and Hochstein, L.I. (eds), *The Biology of Halophilic Bacteria*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1–23.
- Romanovskaia, V.A., Avdeeva, L.V., Gladka, G.V., Pritula, I.R., Kharkhota, M.A. & Tashirev, A.B.** (2013). Resistance of microorganisms of coastal ecosystems of the Dead Sea to extremal factors. *Mikrobiol Z* **75**: 3–11.

- Ronimus, R.S. & Morgan, H.W.** (2003). Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea* **1**: 199–221.
- Ruepp, A. & Soppa, J.** (1996). Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarum* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the *arcRACB* gene cluster. *J Bacteriol* **178**: 4942–4947.
- Russell, N.J.** (1989). Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *J Bioenerg Biomembr* **21**: 93–113.
- Russell, N.J. & Kogut, M.** (1985). Haloadaptation: salt sensing and cell-envelope changes. *Microbiol Sci* **2**: 345–350.

S

- Saitou, N. & Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406–425.
- Sakajiri, Y., Sugano, E., Watanabe, Y., Sakajiri, T., Tabata, K., Kikuchi, T. & Tomita, H.** (2018). *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin Ser81 plays a role in maintaining chloride ions near the Schiff base. *Biochem Biophys Res Commun* **503**: 2326–2332.
- Salzberg, S.L., Delcher, A.L., Kasif, S. & White, O.** (1998). Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res* **26**: 544–548.
- Sambrook, J. & Russell, D.W.** (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandaa, R.A.A., Skjoldal, E.F., Bratbak, G., Foss Skjoldal, E. & Bratbak, G.** (2003). Virioplankton community structure along a salinity gradient in a solar saltern. *Extremophiles* **7**: 347–351.
- Sandler, S.J., Hugenholtz, P., Schleper, C., DeLong, E.F., Pace, N.R. & Clark, A.J.** (1999). Diversity of *radA* genes from cultured and uncultured archaea: comparative analysis of putative RadA proteins and their use as a phylogenetic marker. *J Bacteriol* **181**: 907–915.
- Sankaranarayanan, K., Lowenstein, T.K., Timofeeff, M.N., Schubert, B.A. & Lum, J.K.** (2014). Characterization of ancient DNA supports long-term survival of haloarchaea. *Astrobiology* **14**: 553–560.
- Santos, F., Meyerdierks, A., Peña, A., Rosselló-Mora, R., Amann, R. & Antón, J.** (2007). Metagenomic approach to the study of halophages: the environmental halophage 1. *Environ Microbiol* **9**: 1711–1723.
- Santos, F., Yarza, P., Parro, V., Briones, C., Antón, J.** (2010). The metavirome of a

- hypersaline environment. *Environ Microbiol* **12**: 2965–2976.
- Santos, F., Yarza, P., Parro, V., Meseguer, I., Rosselló-Móra, R., Antón, J., Meseguer, I., Rosselló-Móra, R. & Antón, J.** (2012). Culture-independent approaches for studying viruses from hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* **78**: 1635–1643.
- Saum, S.H., Pfeiffer, F., Palm, P., Rampp, M., Schuster, S.C., Müller, V. & Oesterhelt, D.** (2013). Chloride and organic osmolytes: a hybrid strategy to cope with elevated salinities by the moderately halophilic, chloride-dependent bacterium *Halobacillus halophilus*. *Environ Microbiol* **15**: 1619–1633.
- Savage, K.N., Krumholz, L.R., Oren, A. & Elshahed, M.S.** (2007). *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 19–24.
- Schleifer, K.H.** (2009). Classification of *Bacteria* and *Archaea*: past, present and future. *Syst Appl Microbiol* **32**: 533–542.
- Schmidt, T.M. & Schaechter, M.** (2012). Sediment habitats. In: Schmidt, T.M. and Schaechter, M. (eds), *Topics in Ecological and Environmental Microbiology*. Academic Press, Amsterdam pp. 749.
- Schobert, B. & Lanyi, J.K.** (1982). Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J Biol Chem* **257**: 10306–10313.
- Seaman, P.F. & Day, M.J.** (2007). Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 1–13.
- Seemann, T.** (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**: 2068–2069.
- Serdoz, S., Egri-Nagy, A., Sumner, J., Holland, B.R., Jarvis, P.D., Tanaka, M.M. & Francis, A.R.** (2017). Maximum likelihood estimates of pairwise rearrangement distances. *J Theor Biol* **423**: 31–40.
- Serrano, J.A. & Bonete, M.J.** (2001). Sequencing, phylogenetic and transcriptional analysis of the glyoxylate bypass operon (ace) in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* **1520**: 154–162.
- Sharma, A.K., Walsh, D.A., Baptiste, E., Rodríguez-Valera, F., Ford Doolittle, W. & Papke, R.T.** (2007). Evolution of rhodopsin ion pumps in haloarchaea. *BMC Evol Biol* **7**: 79.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. & McLean, M.D.** (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci* **4**: 446–452.
- Shen, C., Zhang, C., Xin, P., Kong, J. & Ling, L.** (2018). Salt dynamics in coastal marshes: formation of hypersaline zones. *Water Resour Res* **54**: 3259–3276.

- Siegel, B.Z., McMurty, G., Siegel, S.M., Chen, J. & Larock, P. (1979). Life in the calcium chloride environment of Don Juan Pond, Antarctica. *Nature* **280**: 828.
- Sime-Ngando, T., Lucas, S., Robin, A., Tucker, K.P., Colombet, J., Bettarel, Y., Desmond, E., Gribaldo, S., Forterre, P., Breitbart, M. & Prangishvili, D. (2011). Diversity of virus-host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal. *Environ Microbiol* **13**: 1956–1972.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S. & Yongsawatdigul, J. (2008.) Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochem* **43**: 185–192.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R. & Gobbetti, M. (2007). Synthesis of aminobutyric acid by lactic acid Bacteria isolated from a variety of italian cheeses. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7283–7290.
- Skerman, V.B.D. (1967). *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, 2nd ed. The Williams and Wilkins, Baltimore.
- Smucker, A.J.M., Wang, W., Kravchenko, A.N. & Dick, W.A. (2010). Forms and functions of meso and micro-niches of carbon within soil aggregates. *J Nematol* **42**: 84–86.
- Soderberg, T. (2005). Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea* **1**: 347–352.
- Soil Survey Staff (2014). *Keys to Soil Taxonomy*, 12th ed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington DC.
- Soliman, G.S.H. & Trüper, H.G. (1982). *Halobacterium pharaonis* sp.nov., a new, extremely haloalkaliphilic archaebacterium with low magnesium requirement. *Zentral Bakteriell Mikrobiol Hyg* **3**: 318–329.
- Sorokin, D.Y., Elcheninov, A.G., Toshchakov, S. V., Bale, N.J., Sinninghe Damsté, J.S., Khijniak, T. V. & Kublanov, I. V. (2019a). *Natrarchaeobius chitinivorans* gen. nov., sp. nov., and *Natrarchaeobius halalkaliphilus* sp. nov., alkaliphilic, chitin-utilizing haloarchaea from hypersaline alkaline lakes. *Syst Appl Microbiol* **42**: 309–318.
- Sorokin, D.Y., Khijniak, T. V., Elcheninov, A.G., Toshchakov, S. V., Kostrikina, N.A., Bale, N.J., Sinninghe Damsté, J.S. & Kublanov, I. V. (2019b). *Halococcoides cellulovorans* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic cellulose-utilizing haloarchaeon from hypersaline lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**: 1327–1335.
- Sorokin, D.Y., Kublanov, I. V., Yakimov, M.M., Rijpstra, W.I.C. & Sinninghe Damsté, J.S. (2016a). *Halanaeroarchaeum sulfurireducens* gen. nov., sp. nov., the first obligately anaerobic sulfur-respiring haloarchaeon, isolated from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 2377–2381.
- Sorokin, D.Y., Kublanov, I. V., Gavrilov, S.N., Rojo, D., Roman, P., Golyshin, P.N., Slepak, V.Z., Smedile, F., Ferrer, M., Messina, E., La Cono, V. & Yakimov, M.M. (2016b). Elemental sulfur and acetate can support life of a novel strictly anaerobic

haloarchaeon. *ISME J* **10**: 240–252.

Sorokin, D.Y., Makarova, K.S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P.N., Galinski, A., Ciordia, S., Mena, M.C., Merkel, A.Y., Wolf, Y.I., Mark, C.M., Loosdrecht, V. & Koonin, E. V. (2017). Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the euryarchaea evolutionary origin of methanogenesis. *Nat Microbiol* **2**: 17081.

Sorokin, D.Y., Merkel, A.Y., Abbas, B., Makarova, K.S., Rijpstra, W.I.C., Koenen, M., Sinninghe Damsté, J.S., Galinski, E.A., Koonin, E. V. & Van Loosdrecht, M.C.M. (2018a). *Methanonatronarchaeum thermophilum* gen. nov., sp. nov. and 'Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum', extremely halo(natrono)philic methyl-reducing methanogens from hypersaline lakes comprising a new euryarchaeal class *Methanonatronarchaeia* classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 2199–2208.

Sorokin, D.Y., Messina, E., La Cono, V., Ferrer, M., Ciordia, S., Mena, M.C., Toshchakov, S. V., Golyshin, P.N. & Yakimov, M.M. (2018b). Sulfur respiration in a group of facultatively anaerobic natronoarchaea ubiquitous in hypersaline soda lakes. *Front Microbiol* **9**: 2359.

Sorokin, D.Y., Toshchakov, S. V., Kolganova, T. V. & Kublanov, I. V. (2015). Halo(natrono)archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates. *Front Microbiol* **6**: 942.

Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Galinski, E.A., Belloch, C. & Tindall, B.J. (2006). Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp nov. and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 with the type specie. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 379–388.

Sorokin, D.Y., Yakimov, M., Messina, E., Merkel, A.Y., Bale, N.J. & Sinninghe Damsté, J.S. (2019c). *Natronolimnobius sulfurireducens* sp. nov. and *Halalkaliarchaeum desulfuricum* gen. nov., sp. nov., the first sulfur-respiring alkaliphilic haloarchaea from hypersaline alkaline lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **69**: 2662–2673.

Sorokin, I.D., Kravchenko, I.K., Doroshenko, E. V., Boulygina, E.S., Zadorina, E. V., Tourova, T.P. & Sorokin, D.Y. (2008). Haloalkaliphilic diazotrophs in soda solonchak soils. *FEMS Microbiol Ecol* **65**: 425–433.

de Souza, P.M. & Magalhães, P. de O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian J Microbiol* **41**: 850–861.

Srivastava, P. & Kowshik, M. (2015). Biosynthesis of nanoparticles from halophiles. In: Maheshwari, D., Saraf, M. (eds), *Halophiles*. Springer, Cham, pp. 145–159.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. & Whitman, W.B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of

- the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1043–1047.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M.** (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **44**: 846–849.
- Staley, J.T. & Konopka, A.** (1985). Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**: 321–346.
- Stan-Lotter, H., Doppler, E., Jarosch, M., Radax, C., Gruber, C. & Inatomi, K.** (1999). Isolation of a chymotrypsinogen B-like enzyme from the archaeon *Natronomonas pharaonis* and other halobacteria. *Extremophiles* **3**: 153–161.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. & Doudoroff, M.** (1966). The aerobic *Pseudomonads* a taxonomic study. *J Gen Microbiol* **43**: 159–271.
- Stephens, D.W. & Gillespie, D.M.** (1976). Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment. *Limnol Oceanogr* **21**: 74–87.
- Subov, N.N.** (1931). *USSR Oceanographical Institute, Hydrometeorological Communications*, Moscow.
- Sukumaran, R.K., Singhania, R.R. & Pandey, A.** (2005). Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *J Sci Ind Res (India)* **64**: 832–844.
- Sullivan, M.J., Petty, N.K. & Beatson, S.A.** (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **27**: 1009–1010.
- Sumner, D.Y., Jungblut, A.D., Hawes, I., Andersen, D.T., Mackey, T.J. & Wall, K.** (2016). Growth of elaborate microbial pinnacles in Lake Vanda, Antarctica. *Geobiology* **14**: 556–574.
- Sun, D.L., Jiang, X., Wu, Q.L. & Zhou, N.Y.** (2013). Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity. *Appl Environ Microbiol* **79**: 5962–5969.
- Sun, W., Li, J., Jiang, L., Sun, Z., Fu, M. & Peng, X.** (2015). Profiling microbial community structures across six large oilfields in China and the potential role of dominant microorganisms in bioremediation. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 8751–8764.
- Sutton, G.C., Russell, N.J. & Quinn, P.J.** (1991). The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1061**: 235–246.
- Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N. & Kobatake, Y.** (1985). A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. *FEMS Microbiol Lett* **28**: 161–164.

T

- Talon, R., Coquelle, N., Madern, D. & Girard, E.** (2014). An experimental point of view on hydration/solvation in halophilic proteins. *Front Microbiol* **5**: 66.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725–2729.
- Tanuja, S., Srinivas, N.D., Gowthaman, M.K. & Raghavarao, K.S.M.S.** (2000). Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. *Bioprocess Eng* **23**: 63–68.
- Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I. V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D. & Koonin, E. V.** (2001). The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* **29**: 22–28.
- Tatusova, T., Dicuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K.D., Borodovsky, M. & Ostell, J.** (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res* **44**: 6614–6624.
- Tazi, L., Breakwell, D.P., Harker, A.R. & Crandall, K.A.** (2014). Life in extreme environments: microbial diversity in Great Salt Lake, Utah. *Extremophiles* **18**: 525–535.
- Thomas, C., Ionescu, D. & Ariztegui, D.** (2014). Archaeal populations in two distinct sedimentary facies of the subsurface of the Dead Sea. *Mar Genomics* **17**: 53–62.
- Timmers, P.H.A., Vavourakis, C.D., Kleerebezem, R., Damsté, J.S.S., Muyzer, G., Stams, A.J.M., Sorokin, D.Y. & Plugge, C.M.** (2018). Metabolism and occurrence of methanogenic and sulfate-reducing syntrophic acetate oxidizing communities in haloalkaline environments. *Front Microbiol* **9**: 3039.
- Tindall, B.J.** (1992). The family *Halobacteriaceae*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (eds), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer, New York, pp. 768–808.
- Tindall, B.J., Ross, H.N.M. & Grant, W.D.** (1984). *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaebacteria. *Syst Appl Microbiol* **5**: 41–57.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W. & Kämpfer, P.** (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 249–266.
- Tomlinson, G.A. & Hochstein, L.I.** (1976). *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol* **22**: 587–591.

- Tomlinson, G.A. & Hochstein, L.I. (1972). Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. *Can J Microbiol* **18**: 1973–1976.
- Tomlinson, G.A., Jahnke, L.L. & Hochstein, L.I. (1986). *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **36**: 66–70.
- Tomlinson, G.A., Koch, T.K. & Hochstein, L.I. (1974). The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. *Can J Microbiol* **20**: 1085–1091.
- Tomlinson, G.A., Strohm, M.P. & Hochstein, L.I. (1978). The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: the identification of lactobionic acid as a product of lactose metabolism by *Halobacterium saccharovorum*. *Can J Microbiol* **24**: 898–903.
- Torreblanca, M., Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. & Kates, M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* **8**: 89–99.
- Torsvik, V. & Øvreås, L. (2008). Microbial diversity, life strategies, and adaptations to life in extreme soils. In: Dion, P. and Nautiyal, S. (eds), *Microbiology of Extreme Soils*. Springer, Berlin, pp. 15–43.
- Torsvik, V., Øvreås, L. & Thingstad, T.F. (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**: 1064–1066.
- Triadó-Margarit, X. & Casamayor, E.O. (2013). High genetic diversity and novelty in planktonic protists inhabiting inland and coastal high salinity water bodies. *FEMS Microbiol Ecol* **85**: 27–36.
- Trigui, H., Masmoudi, S., Brochier-Armanet, C., Barani, A., Grégori, G., Denis, M., Dukan, S. & Maalej, S. (2011). Characterization of heterotrophic prokaryote subgroups in the Sfax coastal solar salterns by combining flow cytometry cell sorting and phylogenetic analysis. *Extremophiles* **15**: 347–358.
- Tripp, H.J., Sutton, G., White, O., Wortman, J., Pati, A., Mikhailova, N., Ovchinnikova, G., Payne, S.H., Kyrpides, N.C. & Ivanova, N. (2015). Toward a standard in structural genome annotation for prokaryotes. *Stand Genomic Sci* **10**: 45.
- Trüper, H.G. & Galinski, E.A. (1986). Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Experientia* **42**: 1182–1187.
- Tschapek, B., Pittelkow, M., Sohn-Bösser, L., Holtmann, G., Smits, S.H.J., Gohlke, H., Bremer, E. & Schmitt, L. (2011). Arg149 is involved in switching the low affinity, open state of the binding protein AfProX into its high affinity, closed state. *J Mol Biol* **411**: 36–52.
- Tschitschko, B., Erdmann, S., DeMaere, M.Z., Roux, S., Panwar, P., Allen, M.A., Williams, T.J., Brazendale, S., Hancock, A.M., Eloë-Fadrosch, E.A. & Cavicchioli, R. (2018).

Genomic variation and biogeography of Antarctic haloarchaea. *Microbiome* **6**: 113.

Tschitschko, B., Williams, T.J., Allen, M.A., Zhong, L., Raftery, M.J. & Cavicchioli, R. (2016). Ecophysiological distinctions of haloarchaea from a hypersaline Antarctic lake as determined by metaproteomics. *Appl Environ Microbiol* **82**: 3165–3173.

U

Upasani, V.N. & Desai, S. (1990). Sambhar salt lake. Chemical composition of the brines and studies on haloalkaliphilic archaebacteria. *Arch Microbiol* **154**: 589–593.

V

Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R., Enríquez-Aragón, J., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C., Dendooven, L. & Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles* **12**: 247–254.

Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R.J., Estrada-Alvarado, I., Zavala-Díaz de la Serna, F.J., Dendooven, L. & Marsch, R. (2009). Changes in the bacterial populations of the highly alkaline saline soil of the former lake Texcoco (Mexico) following flooding. *Extremophiles* **13**: 609–621.

Vartoukian, S.R., Palmer, R.M. & Wade, W.G. (2010). Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **309**: 1–7.

Vavourakis, C.D., Ghai, R., Rodríguez-Valera, F., Sorokin, D.Y., Tringe, S.G., Hugenholtz, P. & Muyzer, G. (2016). Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Front Microbiol* **7**: 211.

Ventosa, A., Gutiérrez, M.C., García, M.T. & Ruíz-Berraquero, F. (1989). Classification of *Chromobacterium marismortui* in a new genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* **39**: 382–386.

Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. In: Logan, N., Lappin-Scott, H. and Oyston, P. (eds), *Prokaryotic Diversity: Mechanism and Significance*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223–253.

Ventosa, A. & Arahal, D.R. (2002). Physico-chemical characteristics of hypersaline environments and their diversity. In: Gerday, C. and Glansdorff, N. (eds), *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. UNESCO Publishing-Eolss Publishers, Oxford, pp. 10010–10019.

Ventosa, A., Fernández, A.B., León, M.J., Sánchez-Porro, C. & Rodríguez-Valera, F. (2014).

- The Santa Pola saltern as a model for studying the microbiota of hypersaline environments. *Extremophiles* **18**: 811–824.
- Ventosa, A., de la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C. & Papke, R.T.** (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Curr Opin Microbiol* **25**: 80–87.
- Ventosa, A. & Márquez, M.** (1990). *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a new moderately halophilic Gram-positive coccus. *Syst Appl Microbiol* **13**: 29–33.
- Ventosa, A., Márquez, M.C., Sánchez-Porro, C. & de la Haba, R.R.** (2012). Taxonomy of halophilic Archaea and Bacteria. In: Vreeland, R.H. (ed), *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Springer, Dordrecht, pp. 59–80.
- Ventosa, A., Mellado, E., Sánchez-Porro, C. & Márquez, M.C.** (2008). Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. In: Dion, P. and Nautiyal, C.S. (eds), *Microbiology of Extreme Soils*. Springer, Berlin, pp. 87–115.
- Ventosa, A., Quesada, E., Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. & Ramos-Cormenzana, A.** (1982). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *J Gen Microbiol* **128**: 1959–1968.
- Vera-Gargallo, B.** (2018). Diversidad filogenómica y funcional de procariotas de suelos hipersalinos. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Vera-Gargallo, B., Chowdhury, T.R., Brown, J., Fansler, S.J., Durán-Viseras, A., Sánchez-Porro, C., Bailey, V.L., Jansson, J.K. & Ventosa, A.** (2019). Spatial distribution of prokaryotic communities in hypersaline soils. *Sci Rep* **9**: 1769.
- Vera-Gargallo, B., Navarro-Sampedro, L., Carballo, M. & Ventosa, A.** (2018). Metagenome sequencing of prokaryotic microbiota from two hypersaline soils of the Odiel salt marshes in Huelva, southwestern Spain. *Genome Announc* **6**: e00140-18.
- Vera-Gargallo, B. & Ventosa, A.** (2018). Metagenomic insights into the phylogenetic and metabolic diversity of the prokaryotic community dwelling in hypersaline soils from the Odiel Saltmarshes (SW Spain). *Genes (Basel)* **9**: 152.
- Verchère, A., Ou, W.-L., Ploier, B., Morizumi, T., Goren, M.A., Bütikofer, P., Ernst, O.P., Khelashvili, G. & Menon, A.K.** (2017). Light-independent phospholipid scramblase activity of bacteriorhodopsin from *Halobacterium salinarum*. *Sci Rep* **7**: 9522.
- Verhees, C.H., Kengen, S.W.M., Tuininga, J.E., Schut, G.J., Adams, M.W.W., de Vos, W.M. & Oost, J. van der** (2003). The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J* **375**: 231–246.
- Villamor, J., Ramos-Barbero, M.D., González-Torres, P., Gabaldón, T., Rosselló-Móra, R., Meseguer, I., Martínez-García, M., Santos, F. & Antón, J.** (2018). Characterization of ecologically diverse viruses infecting co-occurring strains of cosmopolitan hyperhalophilic Bacteroidetes. *ISME J* **12**: 424–437.

- Villarreal-Chiu, J.F., Quinn, J.P. & McGrath, J.W.** (2012). The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front Microbiol* **3**: 19.
- Viver, T., Orellana, L., González-Torres, P., Díaz, S., Urdiain, M., Farías, M.E., Benes, V., Kaempfer, P., Shahinpei, A., Amoozegar, M., Amann, R., Antón, J., Konstantinidis, K.T. & Rosselló-Móra, R.** (2018). Genomic comparison between members of the *Salinibacteraceae* family, and description of a new species of *Salinibacter* (*Salinibacter altiplanensis* sp. nov.) isolated from high altitude hypersaline environments of the Argentinian Altiplano. *Syst Appl Microbiol* **41**: 198–212.
- Viver, T., Orellana, L.H., Díaz, S., Urdiain, M., Ramos-Barbero, M.D., González-Pastor, J.E., Oren, A., Hatt, J.K., Amann, R., Antón, J., Konstantinidis, K.T. & Rosselló-Móra, R.** (2019). Predominance of deterministic microbial community dynamics in salterns exposed to different light intensities. *Environ Microbiol* **21**: 4300–4315.
- Vogt, J.C., Abed, R.M.M., Albach, D.C. & Palinska, K.A.** (2018). Bacterial and archaeal diversity in hypersaline cyanobacterial mats along a transect in the intertidal flats of the Sultanate of Oman. *Microb Ecol* **75**: 331–347.
- Volcani, B.E.** (1940) Studies on the microflora of the Dead Sea. PhD Thesis. The Hebrew University of Jerusalem.
- Vollmers, J., Wiegand, S. & Kaster, A.K.** (2017). Comparing and evaluating metagenome assembly tools from a microbiologist's perspective - Not only size matters! *PLoS One* **12**: e0169662.
- Vos, M., Wolf, A.B., Jennings, S.J. & Kowalchuk, G.A.** (2013). Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 936–954.
- Vreeland, R.H.** (1987). Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* **14**: 311–356.

W

- Walsh, D.A., Baptiste, E., Kamekura, M. & Doolittle, W.F.** (2004). Evolution of the RNA polymerase B' subunit gene (*rpoB'*) in *Halobacteriales*: a complementary molecular marker to the SSU rRNA gene. *Mol Biol Evol* **21**: 2340–2351.
- Walsh, D.A., Papke, R.T. & Doolittle, W.F.** (2005). Archaeal diversity along a soil salinity gradient prone to disturbance. *Environ Microbiol* **7**: 1655–1666.
- van der Walt, A.J., van Goethem, M.W., Ramond, J.B., Makhalanyane, T.P., Reva, O. & Cowan, D.A.** (2017). Assembling metagenomes, one community at a time. *BMC Genomics* **18**: 521.
- Wang, A., Hsu, M., Yang, C. & Hy, F.** (2015). Bacteriorhodopsin fusion membrane protein

- expression system. *U.S. Patent No. 9,067,985*.
- Wang, C.Y., Chan, H., Lin, H.T. & Shyu, Y.T.** (2010). Production, purification and characterisation of a novel halostable xylanase from *Bacillus* sp. NTU-06. *Ann Appl Biol* **156**: 187–197.
- Wang, X., Han, Z., Bai, Z., Tang, J., Ma, A., He, J. & Zhuang, G.** (2011). Archaeal community structure along a gradient of petroleum contamination in saline-alkali soil. *J Environ Sci* **23**: 1858–1864.
- Warden, A.C., Williams, M., Peat, T.S., Seabrook, S.A., Newman, J., Dojchinov, G. & Haritos, V.S.** (2015). Rational engineering of a mesohalophilic carbonic anhydrase to an extreme halotolerant biocatalyst. *Nat Commun* **6**: 10278.
- Wiebel, C.B., Aguilar, G. & Maertens, M.** (2017). Maximum likelihood difference scales represent perceptual magnitudes and predict appearance matches. *J Vis* **17**: 1.
- Wigington, C.H., Sonderegger, D., Brussaard, C.P.D., Buchan, A., Finke, J.F., Fuhrman, J.A., Lennon, J.T., Middelboe, M., Suttle, C.A., Stock, C., Wilson, W.H., Wommack, K.E., Wilhelm, S.W. & Weitz, J.S.** (2016). Re-examination of the relationship between marine virus and microbial cell abundances. *Nat Microbiol* **1**: 15024.
- Williams, T.A., Foster, P.G., Nye, T.M.W., Cox, C.J. & Embley, T.M.** (2012). A congruent phylogenomic signal places eukaryotes within the *Archaea*. *Proc R Soc B Biol Sci* **279**: 4870–4879.
- Williams, T.J., Allen, M.A., DeMaere, M.Z., Kyrpides, N.C., Tringe, S.G., Woyke, T. & Cavicchioli, R.** (2014). Microbial ecology of an Antarctic hypersaline lake: genomic assessment of ecophysiology among dominant haloarchaea. *ISME J* **8**: 1645–1658.
- Williams, T.J., Allen, M.A., Liao, Y., Raftery, M.J. & Cavicchioli, R.** (2019). Sucrose metabolism in haloarchaea: reassessment using genomics, proteomics, and metagenomics. *Appl Environ Microbiol* **85**: e02935-18.
- Williams, W.D.** (2001). Anthropogenic salinisation of inland waters. *Hydrobiologia* **466**: 329–337.
- Woese, C.R. & Fox, G.E.** (1977). The concept of cellular evolution. *J Mol Evol* **10**: 1–6.
- Woese, C.R., Fox, G.E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B.J. & Stahl, D.A.** (1975). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* **254**: 83–86.
- Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R. & Noller, H.F.** (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol Rev* **47**: 621–69.
- Wood, J.M., Bremer, E., Csonka, L.N., Kraemer, R., Poolman, B., van der Heide, T. & Smith, L.T.** (2001). Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **130**: 437–60.

Woodson, J.D., Peck, R.F., Krebs, M.P. & Escalante-Semerena, J.C. (2003). The *cobY* gene of the archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC-1 is required for de novo cobamide synthesis. *J Bacteriol* **185**: 311–316.

Wu, Z., Liu, J., Yang, H. & Xiang, H. (2014). DNA replication origins in archaea. *Front Microbiol* **5**: 179.

X

Xie, K., Deng, Y., Zhang, S., Zhang, W., Liu, J., Xie, Y., Zhang, X. & Huang, H. (2017). Prokaryotic community distribution along an ecological gradient of salinity in surface and subsurface saline soils. *Sci Rep* **7**: 13332.

Y

Yakimov, M.M., Giuliano, L., Chernikova, T.N., Gentile, G., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. & Golyshin, P.N. (2001). *Alcalilimnicola halodurans* gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, moderately halophilic and extremely halotolerant bacterium, isolated from sediments of soda-depositing Lake Natron, East Africa Rift Valley. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 2133–2143.

Yang, J., Jiang, H., Wu, G. & Liu, W. (2018). Phylum-level archaeal distributions in the sediments of Chinese lakes with a large range of salinity. *Geomicrobiol J* **35**: 404–410.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R. & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol* **12**: 635–645.

Yau, S., Lauro, F.M., DeMaere, M.Z., Brown, M. V., Thomas, T., Raftery, M.J., Andrews-Pfannkoch, C., Lewis, M., Hoffman, J.M., Gibson, J.A. & Cavicchioli, R. (2011). Virophage control of antarctic algal host-virus dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 6163–6168.

Yau, S., Lauro, F.M., Williams, T.J., DeMaere, M.Z., Brown, M. V., Rich, J., Gibson, J.A.E. & Cavicchioli, R. (2013). Metagenomic insights into strategies of carbon conservation and unusual sulfur biogeochemistry in a hypersaline Antarctic lake. *ISME J* **7**: 1944.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* **67**: 1613–1617.

Yoshimatsu, K., Iwasaki, T. & Fujiwara, T. (2002). Sequence and electron paramagnetic resonance analyses of nitrate reductase NarGH from a denitrifying halophilic euryarchaeote *Haloarcula marismortui*. *FEBS Lett* **516**: 145–150.

- Youssef, N.H., Ashlock-Savage, K.N. & Elshahed, M.S.** (2012). Phylogenetic diversities and community structure of members of the extremely halophilic *Archaea* (order *Halobacteriales*) in multiple saline sediment habitats. *Appl Environ Microbiol* **78**: 1332–1344.
- Youssef, N.H., Savage-Ashlock, K.N., McCully, A.L., Luedtke, B., Shaw, E.I., Hoff, W.D. & Elshahed, M.S.** (2014). Trehalose/2-sulfotrehalose biosynthesis and glycine-betaine uptake are widely spread mechanisms for osmoadaptation in the *Halobacteriales*. *ISME J* **8**: 636–649.
- Yuan, P.P., Yin, S., Han, D., Zhang, W.-J. & Cui, H.L.** (2015). *Halorientalis brevis* sp. nov., isolated from an inland salt lake of China. *Curr Microbiol* **71**: 382–386.
- Z**
- Zannier, F., Portero, L.R., Ordoñez, O.F., Martinez, L.J., Farías, M.E. & Albarracín, V.H.** (2019). Polyextremophilic *Bacteria* from high altitude Andean lakes: Arsenic resistance profiles and biofilm production. *Biomed Res Int* **2019**: 1–11.
- Zengler, K.** (2009). Central role of the cell in microbial ecology. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 712–29.
- Zhang, B., Gui, D., Gao, X., Shareef, M., Li, L. & Zeng, F.** (2018). Controlling soil factor in plant growth and salt tolerance of leguminous plant *Alhagi sparsifolia* Shap in saline deserts, northwest China. *Contemp Probl Ecol* **11**: 111–121.
- Zhang, K., Shi, Y., Cui, X., Yue, P., Li, K., Liu, X., Tripathi, B.M. & Chu, H.** (2019). Salinity is a key determinant for soil microbial communities in a desert ecosystem. *mSystems* **4**: 00225-18.
- Zhang, W. & Cui, H.** (2014). *Halomicroarcula limicola* sp. nov., isolated from a marine solar saltern , and emended description of the genus *Halomicroarcula*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 1747–1751.
- Zhang, W. & Cui, H.** (2015). *Halomicroarcula salina* sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1628–1633.
- Zhao, D., Kumar, S., Zhou, J., Wang, R., Li, M. & Xiang, H.** (2017). Isolation and complete genome sequence of *Halorientalis hydrocarbonoclasticus* sp. nov., a hydrocarbon - degrading haloarchaeon. *Extremophiles* **21**: 1081–1090.
- Zhao, S., Liu, J.J., Banerjee, S., Zhou, N., Zhao, Z.Y., Zhang, K. & Tian, C.Y.** (2018). Soil pH is equally important as salinity in shaping bacterial communities in saline soils under halophytic vegetation. *Sci Rep* **8**: 4550.
- Zhaxybayeva, O., Stepanauskas, R., Mohan, N.R. & Papke, R.T.** (2013). Cell sorting analysis of geographically separated hypersaline environments. *Extremophiles* **17**: 265–275.

- Zhilina, T., Miroshnikova, L., Osipov, G. & Zavarzin, G.** (1991). *Halobacteroides lacunaris* sp. nov., new saccharolytic, anaerobic, extremely halophilic organism from the lagoon-like hypersaline Lake Chokrak. *Mikrobiogiya* **60**: 495–503.
- Zhilina, T. & Zavarzin, G.** (1990). A new extremely halophilic homoacetogen bacteria *Acetohalobium arabacticum*, gen. nov., sp. nov. *Dokl Akad Nauk SSSR* **311**: 745–747.
- Zhong, C., Lau, M.W., Balan, V., Dale, B.E. & Yuan, Y.J.** (2009). Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. *Appl Microbiol Biotechnol* **84**: 667–676.
- Zumft, W.G.** (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533–616.
- Zvyagintseva, I.S., Belyaev, S.S., Borzenkov, I.A., Kostrikina, N.A., Milekhina, E.I. & Ivanov, M. V.** (1995). Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field. *Microbiology* **64**: 83–87.

ANEXO

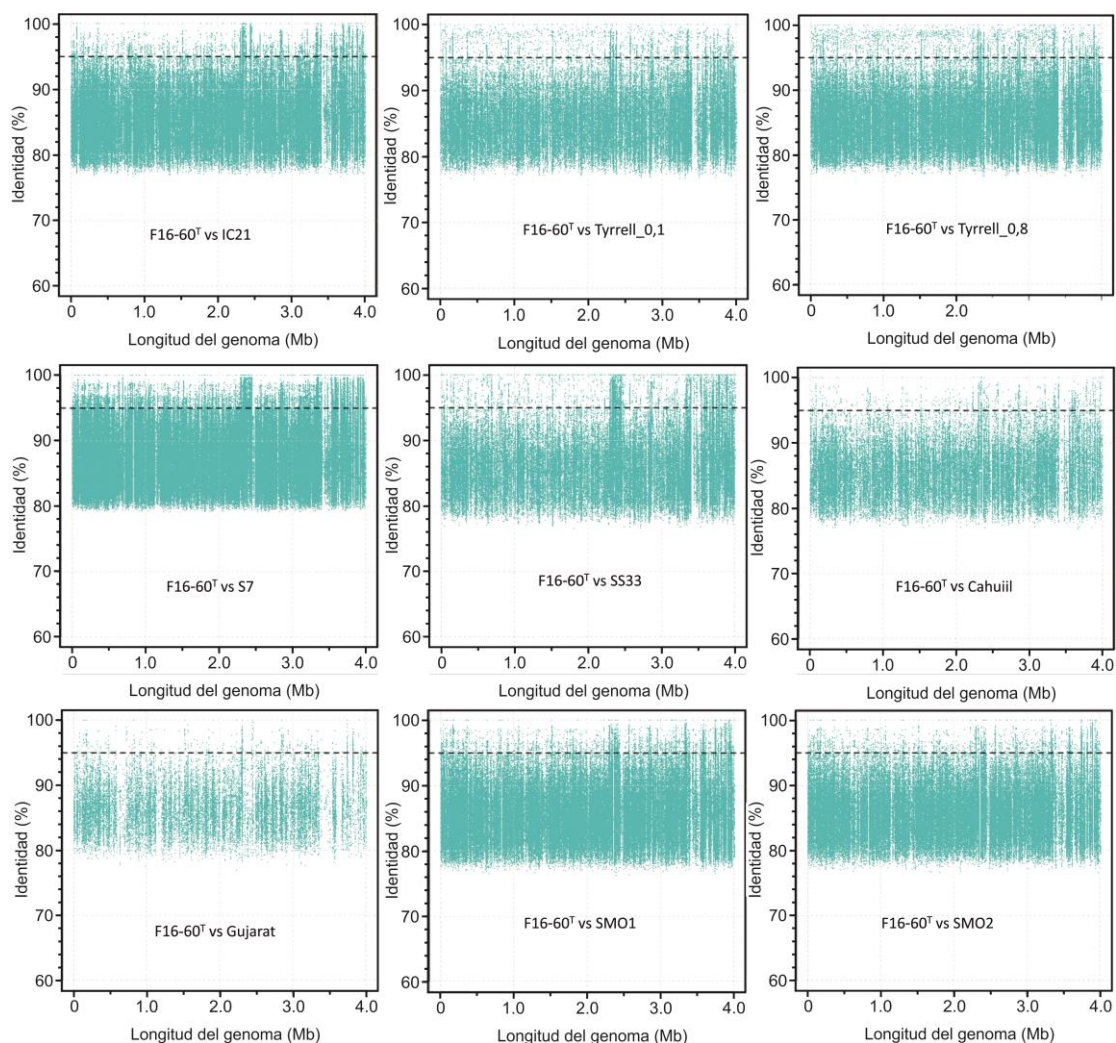


Figura S1. Reclutamientos genómicos de la cepa F16-60^T frente a distintos metagenomas. Se ha utilizado un valor de *cut-off* del 95 % de identidad y una longitud de read <30 pb. La línea negra discontinúa representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie.

Abreviaciones: IC21 - Metagenoma de las salinas de Isla Cristina (Huelva), 21 % salinidad, Tyrrell 0.1 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, Tyrrell 0.8 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, S7 - Metagenoma del lago Fara Fund (Rumania), 30 % salinidad, SS33 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 33 % salinidad, Cahuill - Metagenoma de la laguna Cahuill (Chile), 34 % salinidad, Gujarat - Metagenoma de suelo hipersalino de "Little Rann of Kutch" (Gujarat, India), SMO1 - Metagenoma de suelo hipersalino de las Marismas del Odiel (Huelva), 24 mS/cm salinidad, SMO2 - Metagenoma de suelo hipersalino de las Marismas del Odiel (Huelva), 54 mS/cm salinidad.

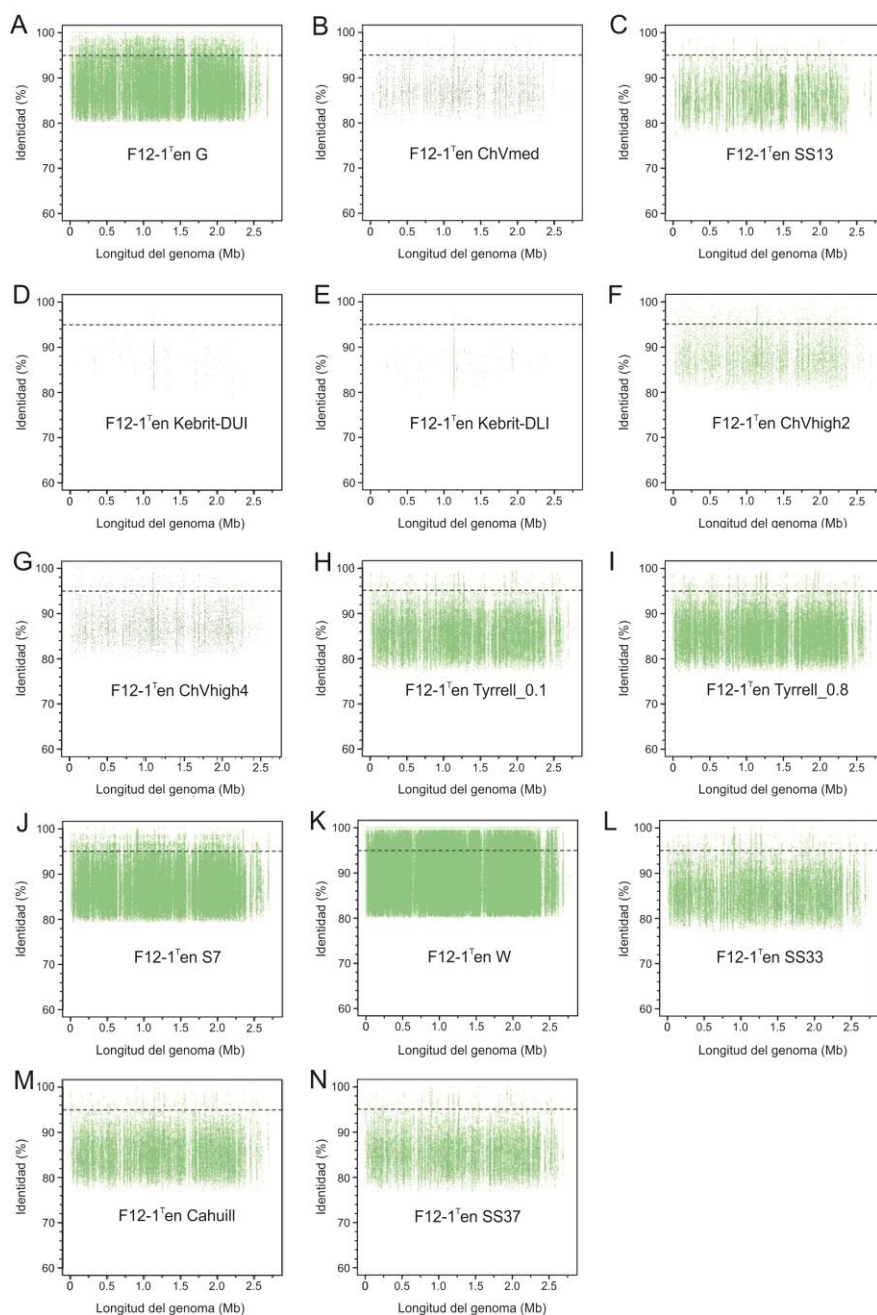


Figura S2. Reclutamientos genómicos de la cepa F12-1^T frente a distintos metagenomas ordenados por gradiente de salinidad. Se ha utilizado un valor de *cut-off* del 95 % de identidad y una longitud de read <30 pb. La línea negra discontinua representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie.

Abreviaciones: **G** - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 5 % salinidad, **ChVmed** - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 12 % salinidad, **SS13** - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 13 % salinidad, **R** - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 18 % salinidad, **Kebrit-DUI** - Metagenoma del Mar Rojo, 18,2 % salinidad, **Kebrit-DLI** - Metagenoma del Mar Rojo, 18,2 % salinidad, **ChVhigh2** - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad, **ChVhigh4** - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad, **Tyrrell 0.1** - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, **Tyrrell 0.8** - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, **S7** - Metagenoma del lago Fara Fund (Rumania), 30 % salinidad, **W** - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 30 % salinidad, **SS33** - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 33 % salinidad, **Cahuill** - Metagenoma de la laguna Cahuil (Chile), 34 % salinidad, **SS37** - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 37 % salinidad.

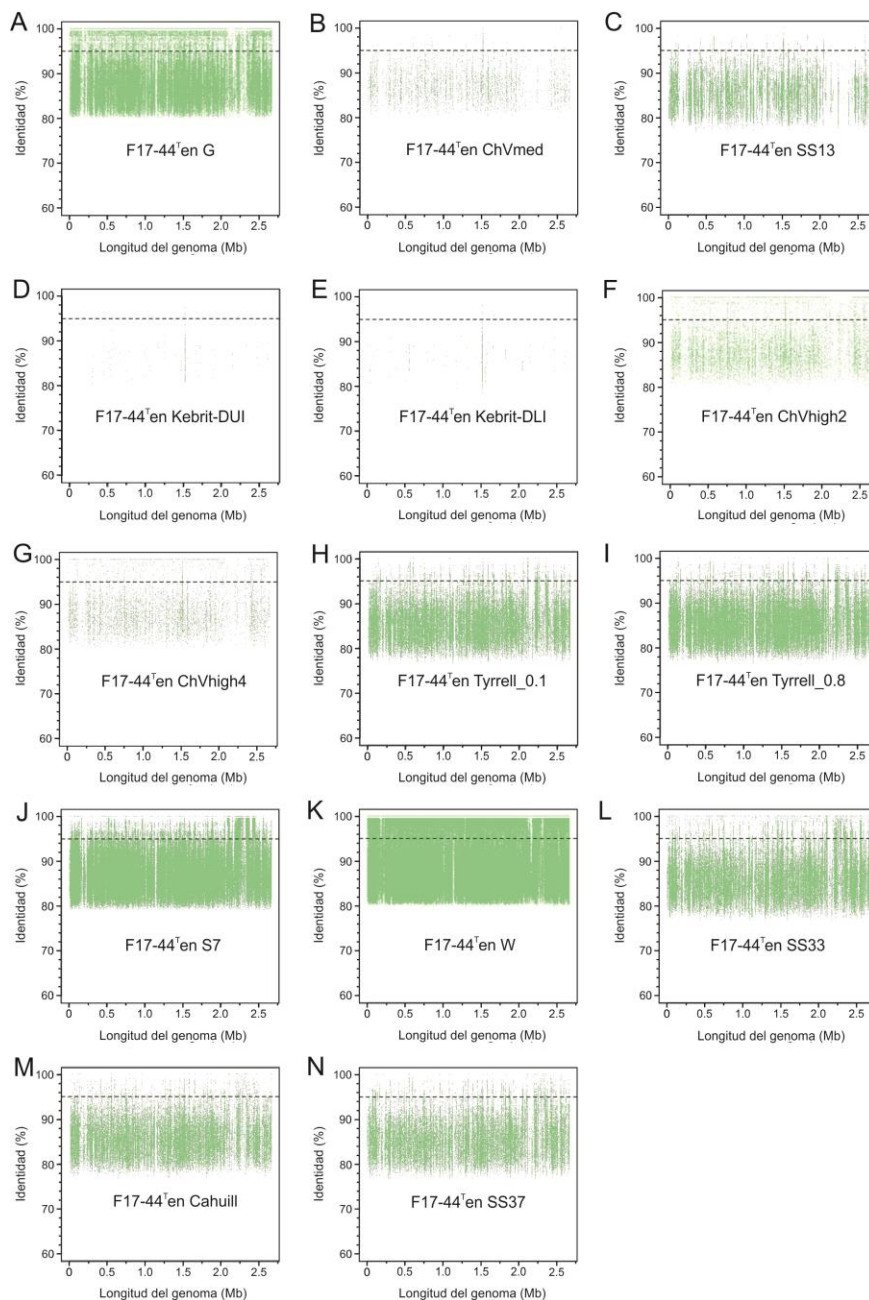


Figura S3. Reclutamientos genómicos de la cepa F17-44^T frente a distintos metagenomas ordenados por gradiente de salinidad. Se ha utilizado un valor de corte del 95 % de identidad y una longitud de read <30 pb. La línea negra discontinua representa el umbral de corte del 95 % a nivel de especie.

Abreviaciones: G - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 5 % salinidad, ChVmed - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 12 % salinidad, SS13 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 13 % salinidad, R - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 18 % salinidad, Kebrit-DUI - Metagenoma del Mar Rojo, 18,2 % salinidad, Kebrit-DLI - Metagenoma del Mar Rojo, 18,2 % salinidad, ChVhigh2 - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad, ChVhigh4 - Metagenoma de las salinas de Chula Vista (California, EE.UU.), 27 % salinidad, Tyrrell 0.1 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, Tyrrell 0.8 - Metagenoma del lago Tyrrell (Victoria, Australia), 29 % salinidad, S7 - Metagenoma del lago Fara Fund (Rumania), 30 % salinidad, W - Metagenoma del lago Meyghan (Irán), 30 % salinidad, SS33 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 33 % salinidad, Cahuill - Metagenoma de la laguna Cahuill (Chile), 34 % salinidad, SS37 - Metagenoma de las salinas de Santa Pola (Alicante), 37 % salinidad.

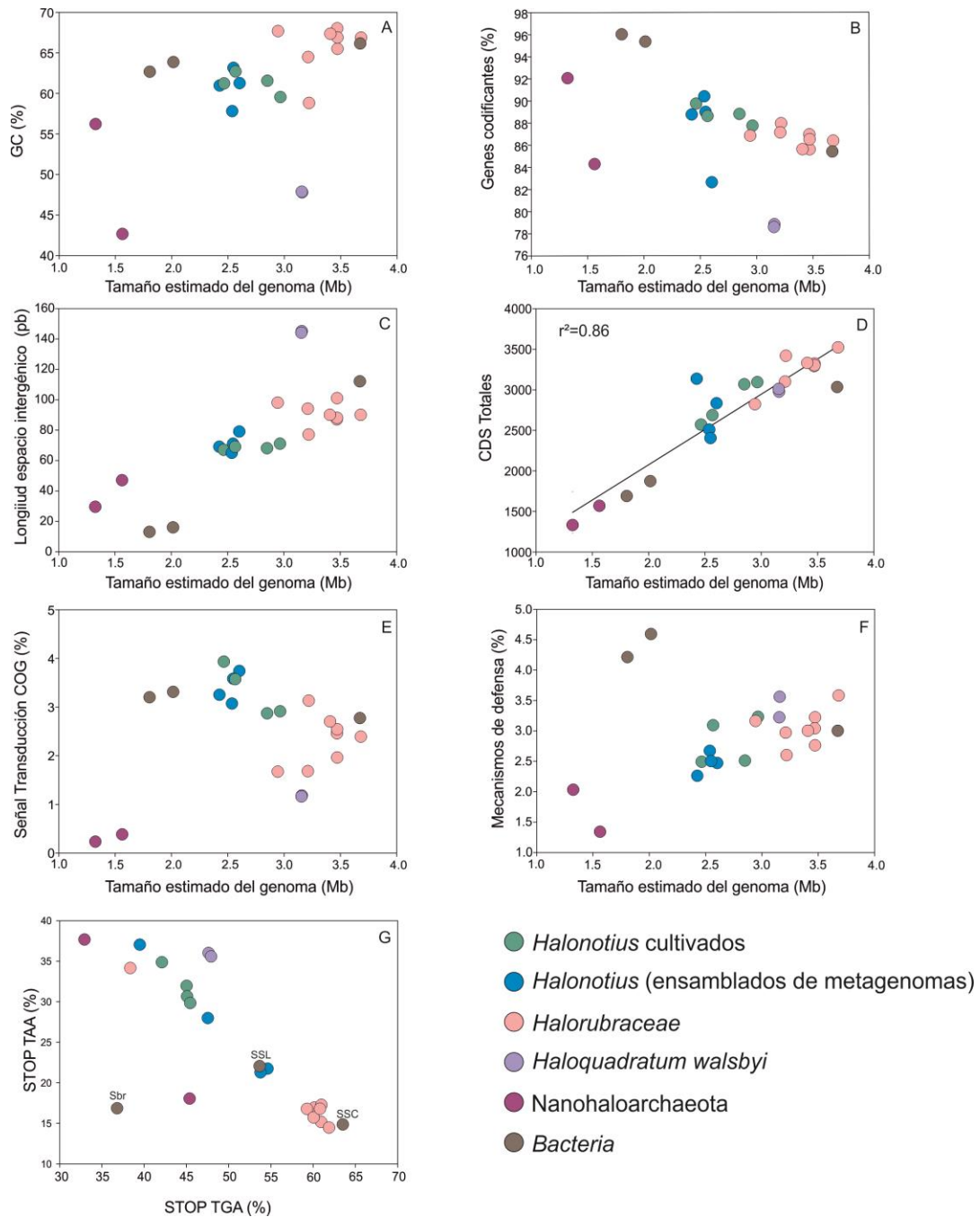


Figura S4. Relación entre diferentes características genómicas entre los genomas de *Halonotius* y otros procariotas seleccionados, relevantes en ambientes hipersalinos. Se ha representado una regresión lineal para mostrar la relación existente entre el tamaño del genoma y el número total de secuencias de ADN codificantes.

Tabla S1. Secuencias de reconocimiento del origen de replicación (ORBs) identificadas en los genomas de las cepas F12-1^T y F18-79.

	Posición en el genoma (nt)	Secuencia	Longitud (pb)	p-value
ORB1 F12-1 ^T	1128943-1128965 1129107-1129129	CGACGCCCTTATACGTAACAGG	22	7.35E-12
ORB2 F12-1 ^T	1129017-1129036 1129100-1129119	TCCAATCCGACGCCCTTAT	19	1.76E-10
ORB1 F18-79	689558-689580 689641-689660	CCAATCCGACGCCCTTATACGT	22	3.00E-12